

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ZEYTİN (*Olea europaea* L.) DAL KANSERİ HASTALIK ETMENİ *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'NİN KANTİTATİF REAL-TIME MEMBRAN BIO-PCR İLE TANISI VE EPİFİTİK POPÜLASYONUN TESPİTİ**

**Doğancan AKTAŞ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**2017**

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ZEYTİN (*Olea europaea* L.) DAL KANSERİ HASTALIK ETMENİ *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'NİN KANTİTATİF REAL-TIME MEMBRAN BIO-PCR İLE TANISI VE EPİFİTİK POPÜLASYONUN TESPİTİ**

**Doğancan AKTAŞ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**Bu tez FYL-2017-2309 no'lu proje olarak Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi tarafından desteklenmiştir.**

**2017**

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ZEYTİN (*Olea europaea* L.) DAL KANSERİ HASTALIK ETMENİ *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'NİN KANTİTATİF REAL-TIME MEMBRAN BIO-PCR İLE TANISI VE EPİFİTİK POPÜLASYONUN TESPİTİ**

**Doğancan AKTAŞ**

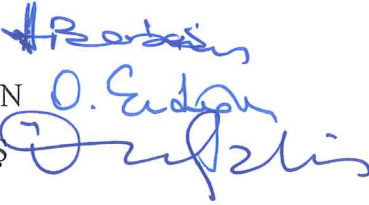
**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

Bu tez 25/05/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hüseyin BASIM

Doç. Dr. Oktay ERDOĞAN

Yrd. Doç. Dr. Özer ÇALIŞ



## ÖZET

### **ZEYTİN (*Olea europaea* L.) DAL KANSERİ HASTALIK ETMENİ *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'NİN KANTİTATİF REAL-TIME MEMBRAN BIO-PCR İLE TANISI VE EPİFİTİK POPÜLASYONUN TESPİTİ**

**Doğancan AKTAŞ**

**Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Hüseyin BASIM**

**Mayıs 2017, 79 sayfa**

Bu çalışmada zeytin yetiştiriciliğinde ekonomik açıdan önemli kalite ve ürün kayıplarına neden olan Zeytin Dal Kanseri hastalık etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'ye özel dizayn edilen primer seti ve LNA (Locked Nucleic Acid) prob kullanılarak geliştirilen hassas ve seçici Real-Time PCR yöntemi ile tanılarını ve tespitleri yapılmıştır.

Real-Time PCR yöntemi için Indoleacetate-lysine ligase (iaaL) gen dizisi kullanılarak *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'ye özel primer seti ve prob geliştirilmiştir. Geliştirilen primer ve prob setlerinin spesifikliğini belirlemek amacıyla *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatları ve farklı bitki patojeni bakteriyel izolatlar ve zeytin DNA'sı test edilmiştir. Test edilen tüm yerli ve yabancı *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatlarında 69 bp'lik amplifikasyon gerçekleşirken, farklı bitki patojeni bakterilerin genomlarında ve zeytin genomik DNA'sında hiçbir amplifikasyon tespit edilmemiştir. Bu çalışmada geliştirilen yöntemin bakteriyel hücre hassasiyet sınırı 2 hücre ve DNA düzeyindeki hassasiyet sınırı ise 11.8 pg olarak tespit edilmiştir.

Epifitik popülasyon içerisindeki sadece canlı *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'leri tespit etmek ve değişimleri kantitatif olarak belirlemek amacıyla Kantitatif Real-Time Membran Bio-PCR yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem ile *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin zeytin ağaçları üzerindeki epifitik popülasyon oranı tespit edilebilmiştir. Yöntemin, farklı bölgelerde veya aynı bölgede farklı zamanlarda uygulanmasıyla epifitik popülasyonlarının değişim oranlarının tespit edilebilmesine olanak sağlamıştır.

Sonuç olarak, Kantitatif Real-Time Membran Bio-PCR yöntemini kullanarak *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin hem bakteriyel hücreden hem de hastalıklı bitki dokularından hızlı (24 dk) ve hassas bir düzeyde tanı ve tespitlerinin yapılabileceği, epifitik popülasyonun ve bu popülasyonun içerisindeki sadece canlı bakterilerin kantitatif olarak tespit edilebileceği ortaya konulmuştur.

**ANAHTAR KELİMELER:** Zeytin, Zeytin Dal Kanseri, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, Kantitatif Real-Time Membran Bio-PCR, Epifitik, Tanı, Tespit

**JÜRİ:** Prof. Dr. Hüseyin BASIM (Danışman)  
Doç Dr. Oktay ERDOĞAN  
Yrd. Doç. Dr. Özer ÇALIŞ



## ABSTRACT

### IDENTIFICATION AND DETECTION OF *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, THE CAUSAL AGENT OF OLIVE KNOT DISEASE AND IT'S EPIPHYTIC POPULATION BY QUANTITATIVE REAL-TIME MEMBRAN BIO-PCR

Doğancan AKTAŞ

Msc Thesis in Plant Protection  
Supervisor: Prof. Dr. Hüseyin BASIM  
May 2017, 79 pages

In this study, a sensitive and selective Real-Time PCR method using LNA (Locked Nucleic Acid) probe was developed for identification and detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (*Pss*) which causes olive knot disease and results in significant loss of quality and product in economic aspects of olive farming.

For Real-Time PCR method, Indoleacetate-lysine ligase (*iaaL*) gene sequence of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* was used in order to develop a specific primer set and probe. *Pss* isolates, different plant pathogenic bacteria genus and total genomic DNA of olives were tested for determination of the specificity of the designed primer and probe sets. Results showed no amplification for the genomes of different plant pathogenic bacteria and olive genomic DNA. On the other hand all local and foreign *Pss* isolates showed amplification at 69 bp. In this study, cell sensitivity limit was 2 cells and the sensitivity limit on DNA level was determined as 11,8 pg.

Quantitative Real-Time Membrane Bio-PCR method was used to detect only alive *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in the epiphytic population and quantitatively determine the population density. By this method, the epiphytic population rate of *Pss* on olive trees could be determined. The method allowed the detection of the rate of change in the epiphytic populations by applying in different regions or in the same region at different times.

In conclusion, Quantitative Real-Time Membrane Bio-PCR method using LNA probes developed in this study, can be used for rapid (24 min), sensitive and quantitatively identification and detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains from direct bacterial cell and diseased olive plant and also can be used for determination of epiphytic population and only alive bacteria within this population.

**KEYWORDS:** Olive, Olive Knot Disease, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, Quantitative Real-Time Membran Bio-PCR, Detection, Identification

**COMMITTEE:** Prof. Dr. Hüseyin BASIM (Supervisor)  
Doç Dr. Oktay ERDOĞAN  
Yrd. Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

## ÖNSÖZ

Bu çalışma kapsamında zeytin bitkisinde kalite ve verimde önemli kayıplara neden olan Zeytin Dal Kanseri hastalık etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin Real-Time PCR yöntemi ile tanı ve tespitini yapmak amacıyla primer seti ve prob tasarlanmış, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin tespiti ve Kantitatif Real-Time Membran Bio-PCR yöntemi ile epifitik popülasyon içerisindeki sadece canlı bakterilerin tespiti kantitatif olarak yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında araştırmalar ve laboratuvar çalışmalarının tümü Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalı Bitki Bakteriyolojisi Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan tüm teknikleri ve gerekli donanımı sağlayan Sayın Hocam Prof. Dr. Hüseyin BASIM'a bana karşı göstermiş olduğu sabır ve ilgiden dolayı teşekkür ederim.

Projeyi mali olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi'ne, çalışmalarım boyunca bana her yönden destek olan aileme, çalışma arkadaşlarıma ve bu süreçte her türlü desteğini esirgemeyen sevgili annem Meryem AKTAŞ'a tüm fedakarlıklardan dolayı teşekkürlerimi bir borç biliyorum.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI.....	13
3. MATERYAL ve METOT.....	32
3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriyel Strainler.....	32
3.2. Primerler ve Probların Tasarlanması.....	33
3.3. Real-Time PCR Optimizasyonu.....	35
3.4. Primer Seti ve Probu <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> Strainlerine Spesifikliğinin Belirlenmesi.....	36
3.5. Primerler ve Probların Saf DNA'dan Hassasiyetinin Belirlenmesi.....	36
3.6. Direkt Bakteriyel Hücreden Primer Seti ve Prob Hassasiyetinin Belirlenmesi.....	36
3.7. Primer Seti ve Probu Seçiciliğinin Belirlenmesi.....	37
3.8. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> 'nin Hastalıklı Bitki Dokularından Tespiti.....	37
3.9. Real-Time Membran Bio-PCR.....	38
3.10. Kantitatif Real-Time Membran Bio-PCR ile Bitki Materyallerindeki Bakteri Populasyon Değişimlerinin Belirlenmesi.....	38
4. BULGULAR.....	40
4.1. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> 'nin Klasik PCR ile Tanısı.....	40
4.2. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> 'nin Real-Time PCR ile Tanısı.....	40
4.3. Real-Time PCR ile <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> Strainlerinin Tanısı.....	41
4.4. Primer Seti ve Probu Saf DNA'dan Hassasiyeti.....	42
4.5. Direkt Bakteriden Primer Seti ve Prob Hassasiyeti.....	43
4.6. Primer Seti ve Probu Seçiciliği.....	46
4.7. Real-Time PCR ile Hastalıklı Bitki Dokularından <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> 'nin Tespiti.....	48
4.8. Real-Time Membran Bio-PCR.....	49
4.9. Kantitatif Real-Time Membran Bio-PCR ile Bitki Materyallerindeki Epifitik Bakteri Populasyon Değişimlerinin Belirlenmesi.....	50
5. TARTIŞMA.....	54
6. SONUÇ.....	59
7. KAYNAKLAR.....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
°C	Santigrat Derece
cm	Santimetre
da	Dekar
g	Gram
ha	Hektar
IU	Uluslar arası Ünite
kcal	Kilokalori
kDa	Kilo Dalton
l	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
ng	Nanogram
pH	Potenz Hidrojen
pg	Pikogram

### Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizimi
biovar	Biyovaryete
bp	Baz Çifti
C	Sitozin
<i>C.</i>	<i>Clavibacter</i>
COST	European Cooperation in Science and Technology
Ct	Eşik Döngüsü
cv.	Kültivar
cfu	Koloni Oluşturan Birim
cfu/ml	Mililitredeki canlı hücre sayısı
CVP	Crystal Violet-Pectate
DAPG	2,4-diacetylphloroglucinol
<i>D.</i>	<i>Dickeya</i>
ddH <sub>2</sub> O	İki Kere Distile Edilmiş Saf Su
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksi Nükleotit Trifosfat
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
ECL	Eşdeğer Zincir Uzunluğu
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
ELISA	Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi
EPPO	Avrupa Bitki Koruma Organizasyonu
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FAM	Fluorescein Amidit

FAME	Yağ Asidi Metil Ester
FPTPN	Domates öz nekrozundan elde edilen floresan <i>Pseudomonas</i> strainleri
G	Guanin
GC	Guanin/Sitozin
genomosp.	Genomik Tür
genomovar	Genomik Varyete
GTB	Gümrük ve Ticaret Bakanlığı
HR	Hipersensitif Reaksiyon
IAA	İndolasetik Asit
<i>iaaH</i>	İndol asetik asit hidrolaz geni
<i>iaaM</i>	İndol asetik asit monooksijenaz geni
IAM	İndolasetamid
ICMP	Uluslararası Bitkisel Kaynaklı Mikroorganizma Koleksiyonu
KB	King's B Ortamı
L.	Linnaeus
LNA	Kilitli Nükleik Asit
LOPAT	Levan üretimi, Oksidaz reaksiyonu, Patates Pektolitik aktivitesi, Arginin Dehidrolazı ve Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi
Mb	Megabaz
mcl-PHA	Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates
MGB	Minor Groove Binding
MLSA	Multi Lokus Sequence Analiz
M.Ö	Milattan Önce
MTBE	Methyl-tetr butyl ether
NA	Nutrient Agar
NaCl	Sodyum Klorür
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
NCPPB	Ulusal Bitki Patojenik Bakteri Koleksiyonu
NDA	Nutrient Agar + 1% Dextrose
NSA	Nutrient Sakkaroz Agar
OD	Optik Yoğunluk
OKA	Zakkum Ur Agar
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCWDE	Bitki Hücre Duvarını Degrede Eden Enzim
PDA	Patates Dekstroz Agar
Pel	Pectate Lyase
Peh	Polygalacturonase
PF	<i>Pseudomonas</i> Agar F
PFGE	Pulsed-Field Jel Elektroforez
Pme	Pectin Methyl Esterase
Pnl	Pectin Lyase
<i>Pss</i>	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>
pv.	Patovar
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
rDNA	Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
rep-PCR	Tekrarlı Dizi Bazlı PCR
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi

RNA	Ribonükleik Asit
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
RS	Roy&Sasser
S	Svedberg Katsayısı
SCAR	Sekansı Karakterize Edilmiş Çoğaltılan Bölge
ssp.	Tür
SSR	Kısa Dizili DNA Tekrarları
subsp.	Alt Tür
syn.	Sinonim
SYBR	Synergy Brands
TAMRA	Karboksitetrametilrodamin
TAE	Tris Asetik Asit EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
tRNA	Taşıyıcı Ribonükleik Asit
U	Ünite
UV	Ultra Viyole
Vir	Virulens
Xav	<i>Xanthomonas axonopodis vesicatoria</i>
YDC	Yeast Dextrose Carbonate
3'	DNA molekülünün 3' terminal hidroksil ucu
5'	DNA molekülünün 5' terminal fosfat ucu

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Zeytin Meyvesi .....	2
Şekil 1.2. Oleuropeinin kimyasal yapı formülü .....	4
Şekil 1.3. Dünyada zeytin üretim alanları.....	7
Şekil 1.4. Türkiye Zeytin Üretimi Haritası .....	10
Şekil 2.1. Zeytin Dal Kanseri simptomları .....	14
Şekil 3.1. Real-Time PCR'da <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> 'nin tanısı için kullanılan HBPSSR ve HBPSSL primerlerinin ve probun gen üzerindeki bağlanma yerleri (Yeşil renk: Real-Time PCR primerlerini, Kırmızı renk: Probu temsil etmektedir) .....	35
Şekil 3.2. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> 'nin hastalıklı bitki dokularından tespiti için stok solüsyon hazırlanması .....	37
Şekil 4.1. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> 'nin Klasik PCR ile Tanısı. M, marker; 1- I2; 2- I7; 3- I21; 4-I9; 5- M2; 6- 0-I; 7- O-II; 8- N-I; 9- N-II; 10- NK (Negatif kontrol) .....	40
Şekil 4.2. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> 'nin Real-Time PCR ile tanısı .....	41
Şekil 4.3. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> 'nin SYBR Green-melt grafiği .....	41
Şekil 4.4. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> Strainlerinin Real-Time PCR ile tanısı .....	42
Şekil 4.5. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> 'nin tespitinde kullanılan primer seti ve probun saf DNA'dan hassasiyeti .....	43
Şekil 4.6. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> 'nin bakteri hassasiyet çalışmasında NA besi ortamında Stok-10 <sup>-10</sup> seyreltmelerde tespit edilen en az bakterinin tespiti .....	45
Şekil 4.7. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> 'nin bakteri hassasiyet tespiti .....	46
Şekil 4.8. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer bitki patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğinin belirlenmesi.....	47
Şekil 4.9. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin, ur oluşturan bakteriyel patojenlere karşı spesifikliğinin belirlenmesi .....	48

Şekil 4.10. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> 'nin oluşturduğu doğal enfekteli zeytin dalı .....	48
Şekil 4.11 Tasarlanan primer ve prob seti ile <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> 'nin enfekteli bitki dokusundan tespiti.....	49
Şekil 4.12. Membran Bio-PCR için stok solüsyon hazırlanması.....	49
Şekil 4.13. Tasarlanan primer,prob seti ve Real-Time Membran Bio-PCR yöntemi ile canlı <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> 'nin tespiti .....	50
Şekil 4.14. Kantitatif Real-Time PCR ile referans standart eğrinin oluşturulması.....	51
Şekil 4.15. Kantitatif Real-Time Membran Bio-PCR ile referans standart eğrinin oluşturulması .....	52
Şekil 4.16. Kantitatif Real-Time Membran Bio-PCR ile referans standart eğrinin oluşturulması .....	53

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Zeytin bitkisinin bilimsel sınıflandırması .....	2
Çizelge 1.2. Zeytin çeşitleri ve yetiştiği bölgeler.....	6
Çizelge 1.3. Dünya Zeytin Dikili Alanı (ha).....	8
Çizelge 1.4. Dünya Zeytin Üretim Miktarı (ton) .....	9
Çizelge 1.5. Türkiye Zeytin Üretimi .....	10
Çizelge 1.6. Türkiye yağlık zeytin üretimi.....	11
Çizelge 2.1. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> 'nin bilimsel sınıflandırması.....	13
Çizelge 2.2. <i>Pseudomonas savastanoi</i> 'nin pathovar ve konukçuları.....	15
Çizelge 2.3. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pathovarlarının fenotipik ve genetik farklılıkları .....	16
Çizelge 3.1 Real-Time PCR'da test edilen yerli <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> strainleri.....	32
Çizelge 3.2. Real-Time PCR'da test edilen yabancı <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> strainleri .....	32
Çizelge 3.3. Real-Time PCR'da kullanılan farklı türe ait bitki patojeni bakteriler .....	33
Çizelge 3.4. <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> strainlerinin klasik PCR ile tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi amacıyla hazırlanan PCR programı.....	33
Çizelge 3.5. Klasik PCR yöntemi ile <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> etmenlerinin tanısı için kullanılan primerler.....	34
Çizelge 3.6. Real-Time PCR yöntemi ile <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> tanısı için geliştirilmiş olan primerler.....	34
Çizelge 3.7. Real-Time PCR yöntemi ile <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> 'nin tanısı için geliştirilmiş olan prob .....	35
Çizelge 3.8. Real-Time PCR optimizasyonu sonucunda <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> için oluşturulan Real-Time PCR programı .....	35
Çizelge 4.1. Real-Time PCR ile <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> 'nin direkt bakteriyel hücreden tespiti ve hassasiyet limitlerinin belirlenmesi .....	44

## 1. GİRİŞ

Son yirmi yılda, moleküler biyoloji ve gen teknolojisi alanlarında kaydedilen büyük gelişmeler, biyoteknolojideki hızlı değişim ve ilerleyişin itici gücü olmuş ve bu teknoloji, giderek çok daha fazla sayıda alanda kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknoloji bilgisayar teknolojilerinde meydana gelen gelişmelerin de katkısıyla Bitki Koruma'da önemli bir kullanım alanı bulmuştur.

Fizyolojik sistemlerin, biyokimyasal süreçlerin, patojenlerin hastalık oluşturma mekanizmalarının, bitki ve patojen genomlarının daha iyi anlaşılması ve DNA, RNA, protein, antikor gibi molekülleri manipülasyon yeteneğimizin artması sonucu konvansiyonel yöntemlere ek tanı, teşhis, tedavi yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır. Yapay olarak çoğaltılmış ve DNA problemleri olarak hazırlanmış olan spesifik DNA fragmantlerinin, niteliği araştırılacak olan hedef DNA molekülü ile birleştirilmesi işlemine "hibridizasyon" denir. Bu çalışmada DNA hibridizasyonunun, gelişen teknoloji sayesinde kantitatif olarak gösterilebildiği Kantitatif Real-Time Membran Bio-PCR yöntemi ile Zeytin Dal Kanseri hastalık etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin tanısı, teşhisi ve epifitik popülasyonu üzerine çalışılmıştır.

Oleacea familyası, *Olea* cinsinin bir türü olan zeytinin (*Olea europaea* L.) anavatanı, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ni de içine alan Yukarı Mezopotamya ve Güney Ön Asya'dır (Heywood 1978). Günümüzde 20. yüzyılın bitkisi olarak gösterilen ve yüzyıllardır önemini yitirmemiş olan zeytin bitkisinin anavatanı Mardin, Hatay, Suriye, Filistin ve Kıbrıs adasını içerisine alan bölge kabul edilmektedir (GTB 2016). Zeytin bitkisinin ilk kültüre alınışı ve ıslahı Sâmililer tarafından olmuştur. Arkeolojik çalışmalar, zeytin yetiştiriciliğinin M.Ö 4.000'li yıllara kadar dayandığını göstermektedir. İlk Grek ve Roma yazıtlarında zeytinin barış ve birlikteliğin ebedi simgesi olduğuna değinilmiştir. Kuran, İncil ve Tevrat'taki sayısız bölümde zeytine yer verilmiştir. Tarihi gelişimi içinde birçok efsaneye kaynak olan zeytin, eski uygarlıkların yazıtları ve kutsal kitaplarında yer almıştır (Ertem 1987, Hehn 1998, Garibağaoğlu ve Baysal 1998).

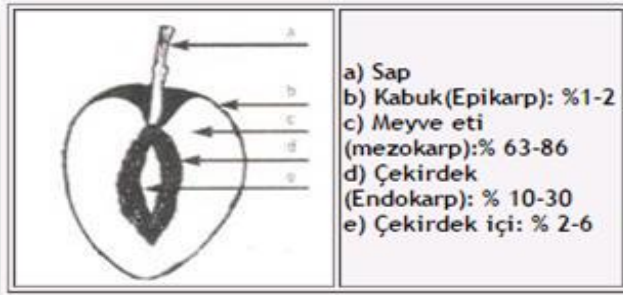
Zeytin, beyaz bir güvercinin Nuh'un gemisine, tufandan sonra canlılık belirtisi olarak, ağzında zeytin dalı ile dönmesi sebebiyle, yüzyılları aşkın süredir barışın simgesi kabul edilmektedir. Bölgede yürütülen bir araştırmada deniz seviyesinden bin metre yükseklikte zeytin ağacı bulunması, Cudi ve Gabar dağlarında bol miktarda yabancı zeytin bitkilerinin olması, Nuh'un gemisinin Ağrı dağına değil esas olarak Cudi dağına konumlandığı rivayetini güçlendirmektedir (Özkaya vd 2010). M.Ö. Atina Anayasasında yer alan ve Aristotle tarafından yazıya alınan "Devlet malı veya özel mülkiyet farkı olmaksızın, zeytin ağaçlarını kesen veya deviren herkes mahkeme tarafından yargılanacaktır, eğer suçlu bulunurlarsa idam yoluyla cezalandırılacaklardır" sözü zeytin ağacının tarihteki yeri ve önemini pekiştirmektedir. Nitekim zeytin yetiştiriciliğinin yayılmasında önemli rol oynayan Romalıların, beslenmelerinde zeytin yerine hayvansal yağları kullananları barbar olarak tanımlamaları, Hipokrat'ın zeytinyağının tedavi edici özelliğini kullanmış zeytin ve zeytin yağının önemi vurgulamaktadır. Zeytinin Dünyaya yayılışı üç farklı coğrafi yoldan olmuştur. Birincisi Mısır üzerinden Tunus ve Fas, ikincisi Anadolu üzerinden Ege adaları, Yunanistan, İtalya ve İspanya ve üçüncüsü ise İran üzerinden Pakistan ve Çin'dir (Özkaya vd 2010). Zeytin bitkisinin bilimsel sınıflandırmadaki yeri Çizelge 1.1.'de belirtilmektedir.

Çizelge 1.1. Zeytin bitkisinin bilimsel sınıflandırması (USDA, Plant Database)

**ALEM:** Plantae**ALT ALEM:** Tracheobionta**ÜST BÖLÜM:** Spermatophyta**BÖLÜM:** Magnoliophyta**SINIF :** Magnoliopsida**ALT SINIF:** Asteridae**TAKIM:** Lamiales**FAMİLYA:** *Oleaceae* (Zeytingiller)**CİNS:** *Olea***TÜR:** *Olea europaea L.*

Zeytinin kromozom sayısı,  $2n=46$ 'dır. Zeytingiller familyasının, 27 kadar cinsi ve 600 kadar türü vardır. Zeytin, boylu bir çalı veya 10 metreye kadar boylanabilen, sık dallı, yayvan tepeli, her dem yeşil yapraklı, fanerofit hayat formu olan bir ağaçtır. Geniş, kıvrımlı bir gövdesi vardır. Ağaç yaşlandıkça, düzgün gri renkli gövde kabuğu giderek çatlar. Ağacın tacı (tepesi), yaklaşık olarak artan boy kadar her sene genişler. Uzun ömürlü bir ağaç olup, yaklaşık 2000 yıl kadar yaşayabilir. Verimli topraklarda taç açık ve asimetric, verimsiz topraklarda ise daha yoğun ve yuvarlaktır. Sürgünleri gri renkli, dikensiz ve hemen hemen üç köşelidir. Mızrak gibi, çok kısa saplı, deri gibi sert yaprakları sürgünlere karşılıklı çiftler halinde dizilmiştir. Yaprakları basit, tam kenarlı ve kenarlar alt yüze doğru hafif kıvrıktır. Yaprığın boyu 20–86 mm, genişliği de 5–17 mm'dir. Yaprakların ucunda sivri bir çıkıntı bulunur. Yaprığın üst yüzü koyu gri-yeşil ve tüysüz, alt yüzü mavimsi gümüşü renkte ve beyaz sık ipeksi tüylerle kaplıdır. Odunu, çürümeye karşı son derece dayanıklıdır (Anonim 2017-a).

Bahar aylarının sonlarına doğru yaprakların koltuğunda seyrek salkımlar halinde açan, küçük beyaz-sarı renkli, kokulu çiçekleri vardır. Rüzgârların yardımı ile çiçek tozlarıyla döllenmiş çiçekler, etli ve yağlı meyveler verir. Meyve önce yeşil, olgunlaştıkça parlak siyah bir renk alır. Etli meyvenin içinde, sert bir çekirdek vardır (Şekil 1.1). Bir çiçek salkımı; 2, 3, 4, 5, bazen de tek bir meyve bulundurabilir. Tek bir zeytin ağacı, yılda ortalama 15 ile 30 kg zeytin verebilir.



Şekil 1.1. Zeytin Meyvesi



Sadece zeytin bitkisinde, acılık veren oleuropein maddesi bulunur. Oleuropein maddesinde, şeker temelli glikozit maddesi bulunmaktadır. Zeytine acılık veren bu madde; zeytin meyvesi çeşitli işlemlerden geçirilirken uzaklaştırılır. Isıtılmadan salamuraya bırakılan zeytinde oleuropein maddesi, elenoic aside dönüşür. Zeytinde bulunan fenolik bileşikler; bitkinin özelliklerini, zeytinin rengini, besin değerini, zeytinyağının kalitesini, çeşitli mikroorganizmalara karşı dayanıklılığını belirler. Zeytine; acı tat, sertlik, renk ve kendine özgü aroma verirler, kararlılığını sağlarlar. Zeytinde bulunan bu fenolik bileşikler oksidasyonu önlerler (Anonim 2010). Zeytindeki serbest bileşenlerin miktarı; zeytinin cinsine, iklim şartlarına, olgunlaşma durumuna, zeytin işleme yöntemine, gelişme koşullarına ve depolama şartlarına bağlı olarak değişir. Zeytin, olgunlaşmaya başladıkça içerdiği fenolik madde miktarı da artmaktadır. Zeytini diğer çekirdekli meyvelerden farklı kılan çeşitli özellikleri vardır: Zeytin tanesinin şeker miktarı, % 2-6 arası değişirken, diğer çekirdekli meyvelerde bu oran %12 dir. Yağ oranı, zeytin çeşitlerinde % 15-30 arası değişirken, diğer tek çekirdekli meyve çeşitlerinde ortalama % 1,5 oranındadır (Tripoli 2005).

Çok uzun yıllar yaşayabilen zeytin bitkisi, toprak ve beslenme istekleri açısından oldukça toleranslı olduğundan Ülkemizde birçok bitkinin yetiştirilemediği kötü şartlara sahip topraklarda yetiştirilmektedir. Yine de zeytin yetiştiriciliğinde iklim sınırlayıcı bir faktör olabilmektedir (Ülger 1989). Her ne kadar zeytin, kurak ve fakir topraklarda bile az suyla, kuvvetli kökleri ve dayanıklı gövdesi sayesinde ömrünü sürdürebilmekte ise de, bu olumsuz şartlar bitkinin meyvesini ve meyvenin yağ kalitesini etkilemektedir. Ülkemiz zeytinliklerinin yaklaşık % 75'i eğimli, dağlık ve yamaçta yer almaktadır. Bu yüzden kültürel önlemler, gerektiği gibi uygulanmamakta ve bunun sonucu elde edilen ürün miktarı yıldan yıla değişim göstermektedir (Tetik 2005).

Zeytin, çok seçici olmamakla birlikte kalkerli-kumlu, bitki besin maddelerince zengin, pH'sı 6-8 seviyesinde olan topraklarda daha iyi bir gelişim göstermektedir. Zeytin üretim alanlarında taban suyu 1m'den daha yakın olmamalıdır. Bu seviyeye yakın taban suyu olan topraklarla mutlaka drenaj uygulanmalıdır. Zeytin bitkisinin iklimsel istekleri göz önüne alındığında optimum gelişim gösterdiği alanlar yıllık sıcaklık ortalamasının 15-20 °C arasında olduğu bölgelerdir. Zeytin bitkisinin içinde bulunduğu vejetasyon dönemine göre sıcaklık istekleri de farklılık göstermektedir; ilk sürgünlerin çıkmasından sonraki oluşumuna kadar ki periyot (Şubat-Mart) 5-10 °C, çiçeklenme döneminde (Mayıs-Haziran) 15-20 °C, meyve oluşumu ve büyüme döneminde (Mayıs-Haziran) 20-25 °C ve meyvenin tam olgunluktan, hasat sonuna kadar olan dönemde (Kasım-Ocak) ise 5 °C'dir (Anonim 2014-a)

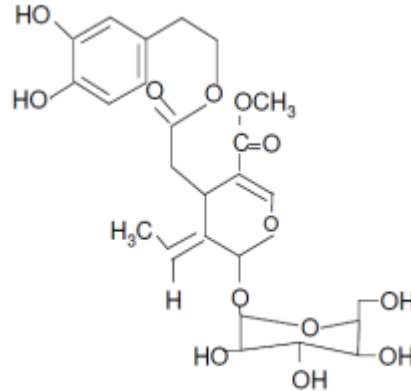
Zeytin bitkisinin soğuklama ihtiyacı 600 ile 1000 saat arasında değişim göstermektedir. Ayrıca zeytinin iyi bir gelişme gösterip, göz oluşumu için yeterli sıcaklık toplamına ihtiyacı vardır. Zeytinin yıllık yağış isteği 650-800 mm' dir. Yaz aylarından, mevsim yağışlarına kadar yapılan sulamalar zeytin irileşmesini ve yağ oluşumunun artmasını sağlamaktadır. Ayrıca bu oluşumlar bir sonraki yıl meyve verecek sürgünlerin gelişimini ve meyve gözlerinin oluşumunu arttırmaktadır (Anonim 2014-a).

Nemli havalarda, ağaç yapraklarından gerçekleşen terleme azalır. Bu nedenle sıcaklığın, bitkiye etkisi de diğer dönemlere göre azalmış olur. Ancak aşırı nem birçok hastalığa uygun ortam hazırlamaktadır. Çiçeklenme zamanı yüksek nem ise döllenmeyi

sınırlandırmaktadır. Mayıs ve Haziran ayı başında esen rüzgarlar, polenleri taşıyarak, döllenmeye yardımcı olurken, kış sonlarında esen rüzgarlar toprak neminin azalmasına yol açar. Zeytin ağacı ışığı çok sevdiğinden bahçe tesisinde güney yönleri tercih edilmelidir. Az ışık, alan sisli dağ etekleri ve vadiler zeytin bitkisi için uygun değildir. 800-900 m'den yüksek mevkilerde zeytin yetiştirilmemektedir (Anonim 2015). Ege Bölgesinde sahil şeridinden 250 km içerilere kadar uzanan zeytin bahçeleri, Akdeniz sahillerinde 850 m'ye kadar olan rakımlarda yetişebilmektedir. Güneydoğu Anadolu'da ise denizden 200-250 km içerilere kadar yayılmakta ve 700 m'ye kadar olan rakımlarda yetişebilmektedir (Ülger 1989). Çizelge 1.2'de zeytin çeşitleri ve yetiştiği bölgeler gösterilmiştir.

Zeytin ağacı önemli özelliklere sahip fenolik maddeler yönünden zengin olup, bu fenolik bileşenlerin en önemlisi oleuropein'dir (Malik ve Bradford 2006, Japon-Lujan vd 2006, Bouaziz vd 2008). İlk kez 1908 yılında Bourquelot ve Vintilesco tarafından varlığı keşfedilen oleuropein bileşiğinin kimyasal yapısı ancak 1960 yılında net olarak tanımlanabilmiştir (Panizzi vd 1960). Araştırmalara göre oleuropein, elenolik asit ve hidroksitriosolün heterozidik esteri olan bir bileşiktir (Şekil 1.2).

Oleuropein, zeytin meyvesinin erken dönemlerinde meyvede fazla miktarda bulunan, olgunlaşmanın ilerlemesi ile zamanla metabolizmaya yayılarak miktarı azalan ve meyveye acı tat veren bir maddedir (Amiot vd 1989, Esti vd 1998, Ryan vd 1999, Sanchez vd 2007). Henüz olgunlaşmamış zeytinlerde oleuropein bileşiği, meyve ağırlığının yaklaşık %2'sini meydana getirmektedir. Meyve tam olgunlaştığı zaman, oleuropein içeriği azalır. Zeytin meyvesinin oleuropein içeriği, genç meyvedeki kuru madde ağırlığının %14'üne kadar olabilmektedir. Küçük meyveli çeşitler, yüksek oleuropein içeriği ile karakterize edilirken, büyük meyveli çeşitlerin genellikle, oleuropeini daha az miktarlarda içerdiği bildirilmektedir (Tokuşoğlu 2010).



Şekil 1.2. Oleuropeinin kimyasal yapı formülü (Winkelhausen vd 2005).

Zeytin ağacının sadece meyvesinde değil, tamamında bulunan oleuropein zeytinde, dolayısıyla posasında, yağında ve zeytinyağı üretiminde meydana gelen atıklarda (alperujo) da bulunmakla birlikte, bu bileşiğin doğada bilinen en büyük kaynağı zeytin yetiştiriciliğinin yan ürünü olan zeytin yapraklarıdır (60-90 mg/g (kuru ağırlık)) (Soler-Rivas vd 2000, Agalias vd 2007). Çalışmalarda zeytinyağında oleuropein içeriğinin % 0.005 ile % 2 arasında değişiklik gösterdiği, alperujoda (atıklarda) % 0.87

ve zeytin yaprağında ise % 1-14 arasında değiştiği belirlenmiştir (Priego-Capote vd 2004, Beauchamp vd 2005).

Çok uzun yıllar yaşayabilme yeteneğine sahip zeytin ağaçlarının ürünleri sağlığa yararlı etkileri sayesinde uzun süredir bilinen gıda maddeleri arasındadır (Soler-Rivas vd 2000). Zeytin ürünlerin yapılarında bulundukları oleuropeinin antioksidan, antimikrobiyal, antiviral, antikarsinojenik, antienflamatuvar, antiaterojenik aktiviteleri dahil olmak üzere önemli farmakolojik özelliklere sahip olduğu çok sayıda araştırmacı tarafından belirlenmiştir (Visioli vd 1998, Owen vd 2000, Visioli vd 2002, Carluccio vd 2003, Micol vd 2005, Tripoli vd 2005, Sanchez vd 2007, Gikas vd 2007).

Araştırmalar, yüksek miktarlarda oleuropein bulunan zeytin yapraklarından elde edilen fenolik fraksiyonunun, lipoprotein oksidasyonunu engellediği ve bu sebeple ek besin olarak önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır (Visioli vd 1995, Tuck ve Hayball 2002). Ayrıca oleuropein'in temel biyoaktif metaboliti hidrokstitriosol'in, doğal bir şekilde elde edilen, güçlü bir antioksidan olduğu, diğer yapısal bileşen elenolik asitin ise güçlü etkilere sahip antiviral etki gösterdiği bildirilmektedir (Fleming ve Etchells, 1967, Renis 1975, Saija vd 1998, Visioli vd 1998). Bu özelliklerinin yanında oleuropein'in alzheimer hastalığının etiyolojik etkeni A $\beta$  amiloid peptid ile non-kovalent bağlar oluşturduğu düşünülmektedir (Bazoti vd 2006, Gikas vd 2007).

Fenolik bileşik Oleuropein'in *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* etmenleri üzerine etkisinin denendiği çalışmalarda, toksik etkinin Gram (+) bakteriler üzerinde Gram (-) bakterilere göre daha yoğun bildirilmiştir. Bu etkinin bakterilerin hücre duvarı yapılarındaki farklılıklardan ortaya çıktığı belirtilmektedir (Furneri vd 2002, Pereia vd 2006, Sanchez vd 2007).

Zeytin meyvesinin içeriğinde yer alan fenolik maddelerin etil asetat ile muamele edildiği diğer bir araştırmada, ekstrakttaki fenolik bileşiklerin *Bacillus cereus* sporlarının çimlenmesini engellediği, saf olarak kullanılan oleuropeinin de aynı etkiyi gösterdiği rapor edilmiştir (Tassou vd 1991).

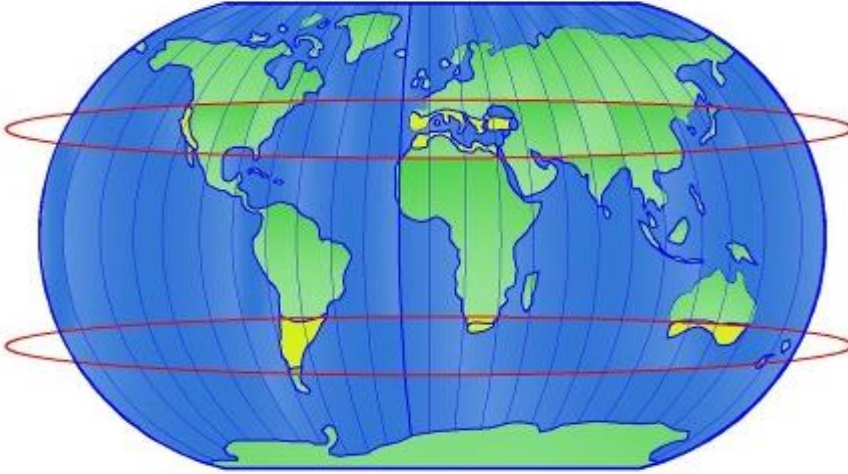
Zeytin yaprağından elde edilen fenolik maddelerinin tümünün gösterdiği antimikrobiyal etkinin, saf haldeki oleuropeinden daha fazla olduğu görülmüştür. Lee ve Lee (2010) zeytin yaprağının etanol özütünden elde ettikleri fenolik bileşikler ile ticari oleuropeinin antimikrobiyal etkisini inceledikleri çalışmalarında, oleuropeinin *Salmonella enteritidis* için güçlü bir inhibitör olduğunu ve zeytin yaprağından elde ettikleri fenolik madde karışımının (oleuropein, rutin, vanilin ve kaffeik asit) sinerjistik etki yaparak *Salmonella enteritidis*'in yanısıra *Bacillus cereus*'a karşı da antimikrobiyal etkisini saptamışlardır.

Türkiye'de geniş alanlara yayılmış olan zeytin bitkisi, büyük bir çeşit aralığına sahiptir. Bu çeşitlerden en az 28 tanesinin ekonomik olarak yetiştirildiği bilinmektedir (Canözer 1991) (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Zeytin çeşitleri ve yetiştiği bölgeler (Anonim 2011)

Zeytin Yetiştirilen Bölgeler	Yetiştirilen Çeşitler
Ege	Ayvalık, Memecik, Ak zeytin, Aşı yeli, Çakır Çilli, Dilmit, Erkence, Eşek zeytini (Ödemiş), Girit zeytini, Hurma kaba, Hurma karaca, İzmir sofralık, Karayaprak, Kiraz, Memeli, Taş arası, Tavşan yüreği, Yağ zeytini, Yerli yağlık çeşitleri
Akdeniz	Büyük Topak Ulak, Çelebi (Silifke), Elmacık, Halhalı (Hatay), Karamani, Sarı Habeşi, Sariulak, Saurani, Sayfi ve Küçük Topakulak
Marmara	Gemlik, Edincik su, Beyaz yağlık, Çelebi (İzmit), Çizmelik (Tekirdağ), Erdek yağlık, Eşek zeytini (Tekirdağ), Samanlı, Şam, Karamürsel su, Siyah salamuralık
Güneydoğu Anadolu	Kilis Yağlık, Nizip Yağlık, Halhalı (Derik), Eğriburun (Nizip), Kan Çelebi, Belluti, Eğriburun (Tatayn), Halhalı, Çelebi, Hamza Çelebi, Hırhalı Çelebi, Hursuki, İri Yuvarlak, Kalem bezi, Mavi, Melkabazı, Tespih Çelebi, Yağ Çelebi, Yağlık Çelebi, Yağlık Sarı Zeytin, Yuvarlak Çelebi, Yuvarlak Halhalı, Yün Çelebi Zoncuk
Karadeniz	Butko, Görvele, Marantelli, Patos, Otur, Sati, Samsun Salamuralık, Samsun Tuzlamalık, Samsun Kırmızı Tuzlamalık, Samsun Yağlık, Sinop No.1, Sinop No.2, Sinop No.4, Sinop No.5, Sinop No.6, Trabzon Yağlık

Akdeniz uygarlığının sembolü olan zeytin ağacı, tarih boyunca bu bölgede kurulan tüm uygarlıkların temelini oluşturmuştur. Zeytinin anavatanının Güneydoğu Anadolu olduğu eskiden beri bilinmektedir. Son dönemlerdeki çalışmalarda Hatay, Kahramanmaraş ve Mardin illerinde zeytin ağacının en alt türünün bulunmuş olması da bu düşüncüyü kesinleştirmektedir. Güneydoğu Anadolu'da ilk yayılışını tamamlayan zeytin bitkisi, Batı Anadolu'ya ve oradan da Ege adaları üzerinden Yunanistan, İtalya, Fransa ve İspanya'ya kadar ilerlemiştir. Sicilya yolu ile Kuzey Afrika'ya taşınan zeytin, Güneydoğu Anadolu'dan ayrılarak Suriye ve Mısır üzerinden ilerleyen ikinci yol ile birleşmiş ve sonuç olarak Akdeniz'in tüm güney kıyılarına yayılmıştır. Bir üçüncü yol da Irak ve İran bölgesinden Afganistan ve Pakistan'a doğru ilerlemiştir. 16. yüzyılda İspanyollar'ın Kuzey ve Güney Amerika'ya götürmesi ile zeytinin Dünya üzerindeki yayılışı tamamlamıştır. Zeytin üretimi, ekonomik olarak 30°- 45° kuzey ve güney enlemleri arasındaki Akdeniz iklimine sahip bölgelerde yapılmaktadır (Şekil 1.3) (Taşçı vd 2010).



Şekil 1.3. Dünya zeytin üretim alanları (30°- 45° kuzey ve güney enlemleri)

Dünya üzerinde 10 milyon hektarın üzerinde zeytinlik mevcuttur ve bu zeytinliklerin % 95'inden fazlası Akdeniz ülkelerindedir. 6 Kıta'da ve yaklaşık 25 ülkede zeytin üretim yapılmaktadır. Tablo 1'de zeytin üretim alanı bakımından dünyanın önde gelen ilk 10 ülkesi yer almaktadır. İspanya, 2,5 milyon hektar ile Dünya zeytin üretim alanının % 24,3'ünü sınırları içerisinde bulundurmaktadır. İspanya'yı % 17,7 ile Tunus, % 11,1 ile İtalya ve % 9,0 ile Yunanistan izlemektedir. Türkiye, % 8 ile Dünya zeytin üretim alanı bakımından 6. sırada yer almaktadır. Türkiye'de, zeytin üretim alanı, 2004 yılından bu yana düzenli olarak artış göstermiştir. 2004 yılında toplam zeytin dikili alan 633.000 ha iken, 2013 yılında bu değer % 30 oranında artarak 825.830 hektara ulaşmıştır. Zeytin üretiminde lider ülke konumunda olan İspanya'da, dikili alanlar nispeten istikrarlı bir seyir izlemiş ve geçtiğimiz 10 yıl içerisinde fazla bir değişim göstermemiştir. Zeytin dikili alanların son 10 yıldaki gelişimine bakıldığında, en fazla alan artışının Fas ve Cezayir'de olduğu görülmektedir. Geçtiğimiz 10 yıl içerisinde söz konusu ülkelere Fas'ta, zeytin dikili alanlar % 56, Cezayir'de ise % 32 oranında artmıştır. Bu durum, Kuzey Afrika ülkelerinin zeytin üretimine ağırlık verdiğinin bir göstergesi olarak algılanmalıdır. Dünya'nın en fazla zeytin dikili alanına sahip ikinci ülkesi Tunus ve daha az üretim alanına sahip Libya da hesaba katıldığında Kuzey Afrika ülkelerinin, Dünya zeytin dikili alanlarının % 32'sine sahip olduğu görülmektedir (Çizelge 1.3) (Saydan 2015).

Çizelge 1.3. Dünya Zeytin Dikili Alanı (ha) (FAO 2015)

Ülkeler	2010	2011	2012	2013	2013 (%)
<b>İspanya</b>	2.475.466	2.503.675	2.504.261	2.500.000	24,3
<b>Tunus</b>	1.763.450	1.763.450	1.810.550	1.822.820	17,7
<b>İtalya</b>	1.190.800	1.144.422	1.125.382	1.146.863	11,1
<b>Yunanistan</b>	834.200	913.800	934.400	930.000	9,0
<b>Fas</b>	830.481	900.743	968.123	922.235	8,9
<b>Türkiye</b>	<b>742.700</b>	<b>786.300</b>	<b>805.500</b>	<b>825.830</b>	<b>8,0</b>
<b>Suriye</b>	647.458	684.490	695.711	697.443	6,8
<b>Cezayir</b>	294.200	311.930	328.884	348.196	3,4
<b>Portekiz</b>	343.219	343.200	345.700	347.300	3,4
<b>Libya</b>	205.000	216.013	205.000	210.000	2,0
<b>Diğer</b>	518.424	521.482	613.656	558.588	5,4
<b>Dünya</b>	9.845.398	10.089.505	10.337.167	10.309.275	-

2013 yılı sonunda Dünya üzerinde 20 milyon ton'un üzerinde zeytin üretimi yapılmıştır (Çizelge 1.4). Zeytin üretim miktarı bakımından başı çeken ülkeler; İspanya, İtalya, Yunanistan ve Türkiye'dir. En fazla dikili zeytin alana sahip olan İspanya, Dünya zeytin üretiminde 1. sırada yer almakta ve Dünya zeytin üretiminin % 38,6'sını tek başına karşılamaktadır. 2011 yılında 7,8 milyon ton zeytin üreten İspanya, olumsuz çevre faktörleri ve zeytin bitkisinin periyodisite göstermesi nedeniyle 2012 yılında 3,8 milyon ton zeytin üretebilmiş, ancak 2013 yılında daha iyi bir üretim sezonu geçirek 7,9 milyon tona yakın üretim yapmıştır. Dünya zeytin üretiminde İspanya'yı, 2,9 milyon ton ile İtalya (% 14,4) ve 2 milyon ton ile Yunanistan (% 9,8) takip etmektedir. Türkiye, 2013 yılında yaklaşık 1,7 milyon ton ile üretim ile İspanya, İtalya ve Yunanistan'dan sonra 4. sırada yer almıştır (Çizelge 1.4). 2013 yılında Dünyada üretilen zeytinin % 8,2'si Türkiye topraklarında olmuştur. Türkiye, 2013 yılında hektardan elde edilen 2,03 ton zeytin ile zeytin verimi yönünden İtalya, İspanya ve Yunanistan'ın arkasından 4. sırada yer almıştır (Çizelge 1.4). 2013 yılında Dünya zeytin verimi ortalaması 1,98 ton/ha olarak rapor edilmiştir (FAO 2015).

Çizelge 1.4. Dünya Zeytin Üretim Miktarı (ton) (FAO 2014)

Ülkeler	2010	2011	2012	2013	2013 (%)
İspanya	7.197.600	7.820.060	3.849.263	7.875.800	38,6
İtalya	3.170.700	3.182.204	3.017.537	2.940.545	14,4
Yunanistan	1.809.900	1.873.900	2.080.800	2.000.000	9,8
<b>Türkiye</b>	<b>1.415.000</b>	<b>1.750.000</b>	<b>1.820.000</b>	<b>1.676.000</b>	<b>8,2</b>
Fas	1.506.473	1.415.902	1.315.794	1.181.675	5,8
Tunus	873.000	562.000	963.000	1.100.000	5,4
Suriye	960.403	1.095.043	1.049.761	842.097	4,1
Cezayir	311.252	610.776	393.840	578.740	2,8
Mısır	390.932	459.650	563.070	510.000	2,5
Portekiz	445.301	443.800	389.900	350.900	1,7
Diğer	1.546.910	1.202.058	1.439.060	1.340.963	6,6
<b>Dünya</b>	<b>19.627.471</b>	<b>20.415.393</b>	<b>16.882.025</b>	<b>20.396.700</b>	-

Türkiye'de zeytin yetiştiriciliği, Cumhuriyet'ten önceki dönemde olduğu gibi Cumhuriyet sonrasında da tarımın en önemli faaliyet kollarında biri olmuştur. 1929 yılında Atatürk'ün zeytinciliğe önem verilmesi yönündeki direktifleriyle Türkiye'de zeytincilik alanında seferberlik başlatılmıştır. Türkiye'nin ilk zeytinyağı ihracatı 1966 yılında yapılmış olup, o yıldan günümüze üretime bağlı olarak ihracat sürekli artarak sürdürülmüştür (Öztürk vd 2009). Türkiye'nin sofralık zeytin ve zeytinyağı ihracatı son dönemde önemli bir artış göstermiştir. İhracattaki artışta yurtdışında yapılan tanıtım seminerleri, ihracatçıların sektöre daha fazla önem vermesi ve ülkemizin rakip ülkelere göre daha üst sınıf ürünlerle pazarda yer alınmasının büyük etkisi olmuştur (Savran ve Demirbaş 2011).

Türkiye'de, 2014 yılı verilerinde göre 8,3 milyon dekar zeytin alanı bulunmaktadır. 2014 yılında, bu alanlardan yaklaşık olarak 1,8 milyon ton zeytin elde edilmiştir (Tuik 2014) (Çizelge 1.5). Zeytin üretiminde 2006 yılının önemi büyüktür. Ülkemizde zeytin fidanı dikimi 2000 yılından başlayarak artış göstermiş, 2005 yılında başlayan yurt içi sertifikalı fidan kullanımının desteklenme kapsamına alınması ile birlikte bu artış giderek hızlanmıştır (Doğaka 2011).

Çizelge 1.5. Türkiye Zeytin Üretimi (Tuik 2014)

Yıllar	Dikili alan (da)	Üretim (ton)	Ortalama Verim (kg/ağaç)	Meyve veren yaşta ağaç (adet)	Meyve vermeyen yaşta ağaç(adet)	Toplam ağaç (adet)
2008	7.743.701	1.464.248	14	106.138.896	45.491.166	151.630.062
2009	7.784.125	1.290.654	12	109.126.769	44.596.288	153.723.057
2010	7.840.313	1.415.000	13	111.397.831	45.757.988	157.155.819
2011	7.984.926	1.750.000	15	117.941.814	37.486.378	155.428.192
2012	8.137.650	1.820.000	15	120.820.948	37.084.206	157.905.154
2013	8.258.266	1.676.000	13	129.160.795	37.868.953	167.029.748
2014	8.260.915	1.768.000	13	140.712.286	28.284.844	168.997.130

Türkiye’de Aydın, İzmir, Bursa, Manisa, Muğla, Balıkesir, Çanakkale, Gaziantep ve Mersin önemli zeytin üretimi yapılan illerdir. Ege, Marmara, Akdeniz, Güneydoğu Anadolu Bölgeleri ise önemli zeytin üreten bölgelerdir (Denk 2004) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Türkiye Zeytin Üretimi Haritası

Türkiye’de yaklaşık 320 bin zeytin üretimi yapan aile işletmesi mevcut olup, bunun % 14’ü Marmarabirlik, Tariş Zeytin ve Zeytinyağı Birliği ortaklarından oluşmaktadır. Tariş Zeytin ve Zeytinyağı Birliği yaklaşık 23 bin, Marmarabirlik ise yaklaşık 31 bin ortağa sahiptir (GTB 2016).

Zeytin meyvesi, sofralık olarak tüketilmesi ve meyvenin etli kısmından aynı zamanda çekirdeğinden elde edilen "yağı" bakımından çok kıymetli bir ağaçtır. Zeytinyağı, sadece zeytin ağacı, (*Olea europaea sativa* Hoffm. et Link) meyvelerinden ve çekirdeğinden elde edilen yağlar olarak tanımlanmaktadır. Zeytinyağı, sadece fiziksel işlem görerek üretilen tek bitkisel yağdır ve bu nedenle de insan sağlığına katkıları yönünden vazgeçilmezdir (Tunalıoğlu 2009). Ham dane iken tüketilemeyen zeytin, işlendikten sonra zeytinyağı, sofralık zeytin, prina ve sabun gibi çeşitli alanlara hammadde kaynağı sağlamaktadır (Tunalıoğlu 1998). Temel bileşenler olarak triaçilgliseroller olup, düşük miktarda serbest yağ asitleri, fosfatidler, gliserol ve pigmentlerden meydana gelmektedir. Bu bileşenlerin, tarımsal ve iklimsel faktörlerinin de etkisiyle zeytinyağının özellikleri üzerine etkisi bulunmaktadır (Özkaya vd 2010).



Dünyada sağlıklı ve dengeli beslenme alışkanlıklarının yanında, uzun yaşama olan ilginin artması, insanları doğal bir sağlık kaynağı olan zeytin ve zeytinyağı tüketimine yöneltmiştir. Üretici ülkeler için ekonomik açıdan önemli ürünlerden biri olan zeytin ve zeytinyağı aynı zamanda Akdeniz'i simgeleyen bir kültürün de parçasıdır.

Ülkemizin önemli tarımsal ihraç ürünlerinden olan zeytin ve zeytinyağı, ülkemiz potansiyeli göz önünde bulundurulduğunda, mevcut sorunların da çözüme kavuşturulmasıyla, tarım sektörümüz için rekabet gücü yüksek olan ürünlerin başında gelmektedir. Son 7 yılda, meyve veren yağlık zeytin ağacı sayısındaki artışa bağlı olarak, Türkiye yağlık zeytin üretimi 950 bin tondan 1 milyon 330 bin tona yükselmiştir (Çizelge 1.6) (GTB 2016).

Çizelge 1.6. Türkiye yağlık zeytin üretimi (Tuik 2014)

Yıllar	Alan (da)	Üretim (ton)	Ortalama Verim (kg/ağaç)	Meyve veren yaşta ağaç (adet)	Meyve vermeyen yaşta ağaç(adet)	Toplam ağaç (adet)
2008	5.616.736	952.145	13	72.539.733	26.017.215	98.556.948
2009	5.602.242	830.641	11	75.190.470	25.547.706	100.738.176
2010	5.638.343	1.040.000	14	75.786.306	26.548.089	102.334.395
2011	5.762.158	1.200.000	15	78.765.335	21.491.376	100.256.711
2012	5.861.052	1.340.000	17	80.568.718	23.999.629	104.568.347
2013	5.948.874	1.286.000	15	83.924.959	27.406.319	111.331.278
2014	6.060.417	1.330.000	14	95.193.078	18.376.988	113.570.066

Zeytin ağaçlarında tek başına veya birlikte zarar yapan pek çok hastalık, zararlı ve yabancı ot bulunmaktadır. Bunlar gerek yağlık ve gerekse de sofralık zeytin üretimini azaltmaktadır. Zeytin üretiminde verim ve kalitede kayıplara sebep olan hastalıklardan biri de zeytin yetiştirilen her alanda görülen *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (ex Smith) (Gardan vd 1992a)'nin neden olduğu Zeytin Uru veya Zeytin Dal Kanseri olarak isimlendirilen bakteriyel bir hastalıktır (Janse 1982).

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (*Pss*)'nin sebep olduğu Zeytin Dal Kanseri endemik bir hastalık olup şiddetli yaprak dökülmelerine ve zeytin ağaçlarının ölümüne sebep olabilmektedir. Zeytin Dal Kanseri hastalığı, dallarda görülen hiperplastik simptomlarla karakterize edilmiştir. Bununla beraber, ürün kaybı ve kalite düşüklüğüne sebep olmaktadır (Varvaro ve Surico, 1984). Patojen, bitki dokularına soğuk ve dolu yaraları, sıvı yapıları hasat sırasındaki açılan yaralar yoluyla girerek bitkilerin dal, sürgün ve gövde kısımlarında hatta yaprak ve meyvelerinde de görülebilen ular oluşturmaktadır (Wilson 1965). Bu yapılar bitkinin besin maddesi ve su alımını engellemekte ve dolayısıyla bitki giderek canlılığını kaybetmekte ve en sonunda da tamamen kurumaktadır. Bu kurumalar, oluşan ular nedeniyle yaprağın ucuna öz su akışını engelleyerek solma kuruma ve erken yaprak dökümüne neden olmaktadır (Gardan vd 1992).

Zeytin ve zakkumdaki ur oluşumunun enfekteli dokularda yüksek miktarlarda, *Pss* tarafından oluşturulan, indole-3-acetic acid (IAA) ve sitokinin üretimi ile bağlantılı olduğu belirtilmiştir ( Smidt ve Kosuge 1978, Comai and Kosuge 1982, Surico vd 1985).

Zeytin Dal Kanseri başlıca Avrupa, Akdeniz ülkeleri ve Kuzey Afrika'da yayılım göstermiştir (Bradbury 1986). Hastalık zamanla yaygınlığını arttırarak zeytin plantasyonu üzerinde ilerlemiş ve farklı ülkeler boyunca, farklı lokasyonlarda rapor edilmiştir (Khlaif 1999).

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (*Pss*) urların yanısıra, simptom göstermeyen bitki dallarında ve yapraklarında epifitik olarak bulunmaktadır. Bu epifitik popülasyon uygun koşullar sağlandığında (yaralanma, yağış, yaprak dökümü vb.) bitkiye giriş yaparak hastalığı meydana getirmektedir (Ercolani 1978).

Bakteriyel patojenlerin tanı ve tespiti izole edilen bitkiye, patojene ve yapılmak istenen tespit amacına göre değişmekte ve geçmişten günümüze kadar geliştirilen yöntemler bulunmaktadır. Bunlar; hastalıklı bitki materyallerinden, besi ortamları üzerine izolasyon, fidelerde belirti izlenmesi, test bitkilerine bulaştırma yöntemi, bakteriyofaj yöntemi, serolojik yöntemler (Presipitasyon, Aglutinasyon, ELISA (Enzim Bağlı İmmüno-sorbent Deneyi), biyokimyasal yöntemler, mikroorganizmaların yağ asidi kompozisyonunun belirlenmesi, protein elektroforezi, mikroskopi ve genetik farklılıkların esas olduğu yeni biyoteknolojik yöntemlerden olan nükleik asit hibridizasyonu, RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi), AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi), sekanslama, PFGE (Pulsed-Field Jel Elektroforez), klasik PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ve Real-Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) gibi yöntemlerdir (Buckingham 2011).

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin neden olduğu Zeytin Dal Kanseri hastalığının etkin anlamda bir kimyasal mücadelesinin olmaması, patojenin erken dönemlerde tespitini gerekli kılmıştır. Bu amaçla, çalışma kapsamında *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'ye spesifik primer seti ve prob geliştirilerek, Real-Time PCR yöntemi ile hastalığın direkt bitki dokularından hızlı, hassas ve kesin bir şekilde tanı ve tespiti amaçlanmıştır. Ayrıca, yine bu çalışma kapsamında *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin zeytin ağaçları üzerinde, epifitik olarak bulunan popülasyonu içerisindeki, sadece canlı bakterilerin, Kantitatif Real-Time Membran Bio-PCR yöntemi ile tespiti amaçlanmıştır.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

Zeytin Dal Kanseri hastalığı, bitkide oluşturduğu urlar sebebiyle eski dönemlerde yumru veya yumrucuk olarak isimlendirilmiş ve Milattan önce 4. yüzyılda Yunan filozof Theophrastus tarafından tanımlanmıştır. Eski Romalılar döneminde Milattan sonra 1. yüzyılda Pliny olarak bilinen hastalık, çok uzun süre böcekler, yanlış tarımsal uygulamalar veya çevresel faktörlerin (düşük sıcaklık zararı, don, sel vb.) sebep olduğu bozukluklar olarak tahmin edilmiştir. 1886'da Arkangeli urlar içerisinde yerleşmiş olan bakterileri bulmuştur. Savastano, 1887-1889 yılları arasında urlardan bakteriyi izole etmiş, yapay infeksiyonlarla zeytinde urlar meydana getirmeyi başarmıştır. Hastalığa ilişkin etiolojik çalışmalar Erwin F. Smith ve J. B. Rorer tarafından 1904'te yapılmış ve 1908'de Savastano'nun anısına *Bacterium savastanoi* olarak isimlendirilmiştir (Panagopoulos 1993). Ferraris tarafından zakkum (*Nerium oleander*) bitkisindeki urlardan izole edilen "*Bacterium tonellianum*" (Ferraris 1926; Gardan vd 1992) olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra *Pseudomonas savastanoi* var. *nerii* (Skerman vd 1989, Gardan vd 1992) olarak isimlendirilen bakteri, Young vd (1978), tarafından *Pseudomonas syringae* içine dahil edilmiştir. Janse (1992), yeni bir alttür olarak *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* şeklinde yeniden adlandırmıştır. Gardan vd (1992), nümerik taksonomi ve DNA-DNA hibridizasyonu çalışmalarına göre *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*'yi ayrı bir tür seviyesine yükselterek *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* olarak yeniden adlandırmışlardır.

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin ait olduğu *Pseudomonas* grubu bakteriler morfolojik özellikleri bakımından düz çubuk şeklindedirler ve bir veya birden fazla polar flagella (kamçı) bulunduran, Gram (-) bakterilerdir (Çizelge 2.1). *Pseudomonas* hücreleri tipik olarak düz çubuk şeklinde olmakla beraber sıklıkla kültür ortamında kıvrık çubuk şeklinde gözlenebilmektedir. Ortalama boyutları 0.5-1 µm ile 1.5-4 µm arasındadır (Palleroni ve Johnson 1989).

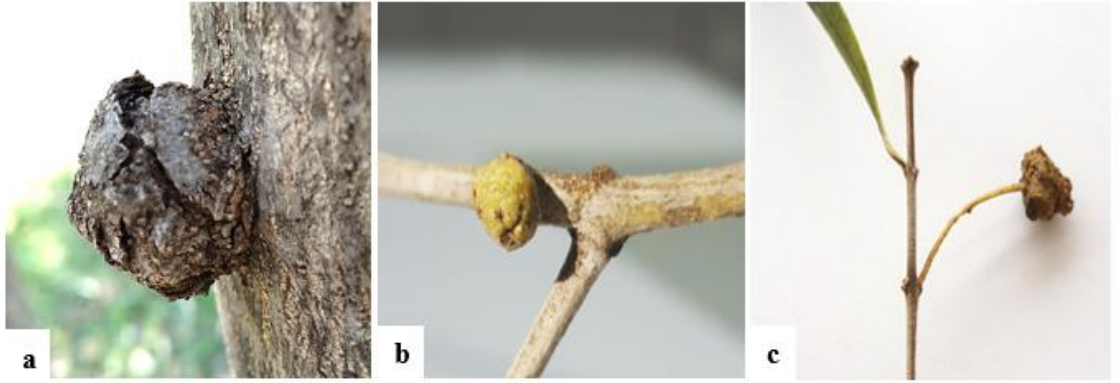
Çizelge 2.1. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin bilimsel sınıflandırması

<b>Alem</b>	Bacteria
<b>Bölüm</b>	Proteobacteria
<b>Sınıf</b>	Gamma Proteobacteria
<b>Takım</b>	Pseudomonadales
<b>Familiya</b>	Pseudomonadaceae
<b>Cins</b>	<i>Pseudomonas</i>
<b>Tür</b>	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> (ex Smith) (Gardan 1992a)

Zeytin Dal Kanseri hastalığı etmeni, *Oleaceae* ve *Apocynaceae* familyasına ait farklı bitkilerde yaprak, sürgün, gövde ve nadiren meyvede ur oluşumuna neden olur. Etmenin konukçuları olarak Zeytin (*Olea europea* L.) (Smith 1908, Young vd 1978), Zakkum (*Nerium oleander* L.) (Wilson 1965), Yasemin (*Jasminium officinale* L.) (Janse 1981), Dişbudak (*Fraxinus excelsior* L.) (Janse 1981), Forzitya çalısı (*Forsythia* sp.) (Iacobellis vd 1998), Mersin çalısı (Mirik vd 2006), Cılbırtı çalısı (*Fontanesia phillyreoides*.) (Mirik vd 2011) ve Çin ardıcı (*Loropetalum chinense*) (Conner vd 2014) saptanmıştır.

Bozkurt vd (2014), Doğu Akdeniz’de yaptıkları çalışmada, nar ağacı dal ve sürgünlerinde urlara rastlamışlardır. Olası hastalık nedenini belirlemek için izolatlara biyokimyasal testler, yağ asidi analizi ve PCR işlemi yapmışlardır ve yapılan patojenisite testleri sonucunda nar ağaçlarında urların oluştuğu gözlemlenmiştir. *Pss*’ye spesifik primerlerle yapılan PCR işleminde tüm izolatlardan tek bir amplifikasyon elde edilmiştir. Sekans sonuçlarına göre Türk izolatları ile veri tabanındaki *Pss* gen dizileri %99 oranında benzerlik göstermiştir. Belirtilere, biyokimyasal, moleküler ve patojenisite testlerine göre nar ağacında gözlenen urların etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* olarak belirlenmiştir. Bu çalışma ile nar, Türkiye’de ve Dünyada ilk kez, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*’nin konukçusu olarak rapor edilmiştir.

Zeytin dal kanseri hastalığı, dallarda görülen hiperplastik simptomlarla karakterize edilmiştir. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*’nin sebep olduğu Zeytin Dal Kanseri endemik bir hastalık olup, şiddetli yaprak dökülmelerine ve zeytin ağaçlarının ölümüne sebep olabilmektedir. Aynı zamanda, ürün kaybı ve kalite düşüklüğüne sebep olmaktadır (Varvaro ve Surico 1984). Temel olarak dallarda, genç sürgünlerde, gövdede, yapraklarda ve nadir olarak meyvelerde görülebilmektedir (Şekil 2.1). Dünyada zeytin yetiştirilen neredeyse tüm alanda rastlanmaktadır. Zeytin Dal Kanseri Hastalığı kalite ve verimde önemli kayıplara sebep olmaktadır (Young vd 2004).



Şekil 2.1. Zeytin Dal Kanseri hastalığı sonucu (a) gövde (b) dal (c) yaprak sapında oluşan urlar (Bu çalışmadan)

Young vd (1996), yaptığı çalışmalar sonucu *Pseudomonas savastanoi*'yi 6 pathovara ayırmıştır ve bu pathovarların konukçuları listelenmiştir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. *Pseudomonas savastanoi*'nin pathovar ve konukçuları

Pathovar	Konukçu
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>fraxini</i>	Dişbudak ( <i>Fraxinus excelsior</i> )
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	Soya ( <i>Glycine max</i> )
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>nerii</i>	Zakkum ( <i>Nerium oleander</i> )
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Fasulye ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>retacarpa</i>	İspanyol süpürgesi ( <i>Retema sphaerocarpa</i> )
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Zeytin ( <i>Olea europaea</i> )
	Zakum ( <i>Nerium oleander</i> )
	Ligistrum ( <i>Ligustrum</i> sp. )
	Yasemin ( <i>Jasminium officinale</i> )
	Forzitya çalısı ( <i>Forsythia</i> sp.)
	Mersin çalısı ( <i>Myrtus communis</i> )
	Cılbırtı çalısı ( <i>Fontanesia phillyreoides</i> )
	Çin ardıcı ( <i>Loropetalum chinense</i> )
	Kurtbağrı ( <i>Ligustrum japonicum</i> )

Ramos vd. (2012), *Pseudomonas savastanoi* pathovarlarını izole edildikleri konukçunun yanında diğer konukçularda çapraz patojenisite çalışmaları ile pathovarlar arasındaki farklılıklarını belirlemişlerdir. *Pseudomonas savastanoi* pv. *fraxini*, *nerii* ve *savastanoi* pathovarları dişbudakda ur oluştururken, *retacarpa* pathovarı ise ur oluşumu göstermemiştir. Zakkum bitkisinde sadece *nerii* ve İspanyol süpürgesinde (*Retema sphaerocarpa*) ise sadece *retacarpa* pathovarı ur oluşumuna sebep olmuştur. (Çizelge 2.3)

Ekonomik açıdan etmenin en önemli konukçusu zeytindir. Hastalık etmeni yara patojenidir. Bitki üzerinde yara olmadığı durumda patojen, bitkiye giriş yapamamaktadır. Hastalık etmeni enfekteli ağaçların üzerinde bulunan urlarda canlılığını sürdürebilirken, toprakta uzun süre yaşamını sürdüremez. Uurlar üzerinden ve epifitik olarak bulunduğu bitki yüzeyinden, sağlıklı bitkilere yağmur, rüzgar, böcek ve insan faaliyetleri ile yayılmakta ve yaralardan giriş yaparak enfeksiyonu gerçekleştirmektedir. Zeytin üretim alanında tek bir ağacın *Pss* ile enfekteli olması durumunda bir yıldan daha az bir süre içerisinde bahçenin büyük bir kısmına yayılabilmektedir. Enfekteli ağaçlarda bulunan bakteriler yağmurlu ve ılık geçen aylarda popülasyon seviyesini maksimuma ulaştırabilmektedir (Ramos vd 2012).

Çizelge 2.3. *Pseudomonas savastanoi* pathovarlarının fenotipik ve genetik farklılıkları (Ramos vd 2012)

<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv.	Konukçular				Hormon genlerinin yeri		
	Dişbudak	Zakkum	Zeytin	İspanyol Süpürgesi	<i>iaaMH</i>	<i>iaaL</i>	<i>ptz</i>
<i>fraxini</i>	Siğil benzeri	-	Siğil benzeri	-	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor
<i>nerii</i>	Ur	Ur	Ur	-	Plazmid	Plazmid	Plazmid
<i>savastanoi</i>	Ur	-	Ur	-	Kromozom	Kromozom	Kromozom
<i>retacarpa</i>	-	-	-	Ur	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Bilinmiyor

Zeytin, zakkum ve dişbudak gibi farklı konukçulardan izole edilen *Pseudomonas savastanoi* izolatları çarpaz olarak yapılan patojenisite testleri sonucunda: zeytinden elde edilen izolatlar sadece zeytinde ur oluşturmuş, zakkum izolatları zakkum ve zeytinde simptom oluştururken, dişbudaktan izole edilen bakteri ise sadece kendi konukçusunda ur oluşturmuştur (Iacobellis vd 1998).

Surico (1993), zeytin ve zakkumdan izole edilen *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatlarının süspansiyonlarını kendi konukçuları olan zeytin ve zakkum yapraklarına ayrı ayrı inokule edildiğinde, zakkumdan alınan izolatların hem zeytin hem de zakkumun zedelenmiş yapraklarında kansere neden olduğunu; ancak zeytin izolatlarının sadece zeytin yaprakları üzerinde urlara sebep olduğunu saptamış ve SEM (Scanning Electron Microscop) çalışmaları ile de doğrulandığını bildirmiştir.

Patojen, bitki dokularına genellikle soğuk ve dolu yaraları, sıklıkla yapılan hasat sırasındaki açılan yaralar yoluyla girerek bitkilerin dal ve gövde kısımlarında hatta yapraklarında da görülebilen urlar oluşturmaktadır (Wilson, 1965). Bu yapılar bitkinin besin maddesi ve su alımını engellemekte ve dolayısıyla bitki giderek canlılığını kaybetmekte ve en sonunda da tamamen kurumaktadır. Bu kurumalar, oluşan urlar nedeniyle yaprağın ucuna öz su akışını engelleyerek solma kuruma ve erken yaprak dökümüne neden olmaktadır (Gardan vd 1992).

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* dalların dışında, kök boğazında, yapraklarda ve nadiren meyvelerde gözlelenebilmektedir. Uurlar önce yeşil renktedir, sonra grileşir ve giderek koyu bir renk alır. Uurların üzeri başlangıçta düz, süngerimsi iken sonra pürüzlenir, zamanla odunlaşır ve sertleşerek siyah renk alır. Nemli ilkbahar dönemlerinde urlardan akışkan bir madde yayılır ve bu akışkan madde içerisinde bol miktarda bakteri bulundurmaktadır. Bitkiler genç dönemde hastalandığında yaşlı bitkilere nazaran daha fazla etkilenmekte ve kurumalar ortaya çıkmaktadır. Yaşlı dallarda hastalık şiddetine bağlı olarak bitki gelişiminde yavaşlama, durma ve verimde azalma meydana gelmektedir. Çevre koşullarının hastalık için optimum olduğu dönemlerde, hastalık şiddeti daha fazla olur. Bu koşullarda gerçekleşen enfeksiyonlar, çok daha yoğun olup, birkinin kurummasına sebep olabilir (Gardan vd 1992).

Hastalık özellikle ana dal ve sürgünlerde ur oluşumuna sebep olur. Bunun yanında kök, kabuk, yaprak, yaprak sapı ve meyve dalında da ur oluşumuna sebep olabilir. Başlangıçta urlar yumuşak ve sarımsı olmasına rağmen daha sonra sertleşir ve kahverengi nekrotik alanlar şeklinde görünür (Janse 2005).

Bakteri, kışı bulaşık ağaçlardaki taze urlar içerisinde geçirir. Patojen, urlar içerisinde yıl boyunca çoğalır. Islanma ve nem olmadığı zaman enfeksiyon az görülür. Nemli ilkbahar aylarında urlardan yayılan akışkan maddeye dokunan kuşlar, böcekler ve budama makasları bakteriyi enfektesiz ağaçlara taşımaktadır. Siyah renge dönen urlar içerisindeki bakteriler canlılığını kaybettiği için hastalık meydana getirme yetenekleri yoktur. Patojenin, bitkide hastalığa sebep olabilmesi için mutlaka yaralardan girmesi gerekmektedir. Doğal açıklıklardan giriş yapabilmektedir fakat bu yolla giren bakteri hastalığı meydana getirememektedir. Sırıkla yapılan hasat sırasında sürgünlerde ve dallarda meydana gelen yaralar, dolu yaraları, don sebebiyle oluşan çatlaklar, budama ve aşı ile oluşan yaralar, yaprak dökümü ile meydana gelen yaralar, böcek zararı (özellikle zeytin sineği, *Dacus olea*) ve rüzgâr esnasında dalların birbirine sürtmesi sonucu açılan yaralar bakterinin bitkiye giriş yollarıdır. Bakteri, budama aletleri ve diğer ekipmanlarla da diğer bitkilere taşınabilir. Sıcaklık, hastalığın oluşumunda önemli bir etken değildir. Hastalık etmeninin gelişmesi için optimum sıcaklık 22-24°C; maksimum 32°C ve minimum 5-10 °C'dir (Saygılı vd 2008).

Patojen, zeytin bitkilerinde soğuk, dolu, böcek zararı, kültürel işlemler vs. sebebiyle açılan yaralardan kolaylıkla girmekte, bitkilerin dal ve gövde kısımlarında hatta yaprak ve meyvelerinde görülebilen ur şeklinde odunsu yapılar oluşturmaktadır. Enfeksiyon kambiyum aktivitesine ihtiyaç duyar ve enfeksiyon üç aşamada gerçekleşir. Bu aşamalar; bitki dokularında bakterinin kolonize olması ve yumuşak boşlukların meydana gelmesi, enfekteli boşlukların etrafında bitki hücrelerinin çoğalması, ksilem ve floem hücrelerinin farklılaşması şeklindedir (Wilson 1965).

Varvaro ve Ferulli (1983), yaptığı bir çalışmada patojenin zeytin bitkisinin tüm toprak üstü aksamalarında yayılabildiğini ve çoğalabildiğini göstermiştir. Yapraklara spreyleme yöntemiyle yapılan bulaştırma sonrası, bakteriyel popülasyonun oldukça az bir miktarda 3-5 gün içerisinde ölüm gözlemlenmiştir. Bulaştırmadan 30 gün sonra yapraklardaki popülasyon yaklaşık olarak  $10^3$  cfu/ml olarak tespit edilmiştir.

Bitkinin genotipi, bitkinin yaşı, *Pseudomonas savastanoi*'nin enfeksiyon alanındaki konsantrasyonu ve ilgili bakteri ile diğer bakteri türleri arasındaki interaksiyon gibi bir takım faktörler hastalık gelişimini etkilemektedir (Marchi vd 2006, Penvalyer vd. 2006).

Hastalık gelişiminde sıcaklık sınırlayıcı bir faktör değildir. Patojenin gelişimi için, minimum 5-10°C, optimum 22-24°C, maksimum 32°C'dir. Doğal enfeksiyonların büyük çoğunluğu ekim ile haziran ayları arasında yağmurlu geçen periyotlarda oluşmaktadır. Urlar ise ağaçların aktif olarak gelişiminin sürdürdüğü bahar ve yaz dönemleri başında meydana gelmektedir. Bu sebeple sonbahar sonunda meydana gelen enfeksiyonlar bahara kadar fark edilmemektedir. Ancak ilkbahar'daki enfeksiyonlardan 10-15 gün sonra urların belirgin hale geldiği gözlemlenmiştir (Teviotdale 1994).

Urların ve epifitik bakteriyel popülasyonun bulunduğu alanların inokulum kaynağı olduğunu belirlenmiştir. Yağmurlu sezonlarda (Nisan ve Kasım ayları arasında) su, patojeni bitkinin odunsu dokularına transfer ettiğinde enfeksiyonlar meydana gelmekte ve enfeksiyon, 4-38 °C arasında gerçekleşebilmektedir. Fakat optimum 23-24 °C'de oluşmaktadır (Cayuela vd 2006).

Zeytin Dal Kanseri hastalığının tipik belirtileri, konukçu bitkilerin sürgün ve dallarında, dökülen yaprak izleri veya çeşitli şekillerde oluşan yaralar üzerinde gelişen *Pss*'nin sebep olduğu 1-5 cm çapındaki urlardır. Genellikle hasat sırasında açılan yaraların yüzey alanının büyük olması, bu bölgelerde görülen urların çok büyük olmasının sebebidir. Urlar su ve besin maddesi iletimini engelleyerek, yaprak dökülmelerine, sürgünlerin ve dalların kuruyarak canlılığını kaybetmesine neden olmaktadır (Teviotdale 1994).

Hastalık başlıca Avrupa, Akdeniz ülkeleri ve Kuzey Afrika'da yaygınlık göstermiştir (Bradbury 1986). Zamanla yaygınlığını arttırmış, zeytin plantasyonu üzerinde ilerlemiş ve ülkeler boyunca, farklı lokasyonlarda rapor edilmiştir (Khlaif 1999). Dünya genelinde farklı araştırmacıların yaptığı sörvey çalışmalarında *Pseudomonas savastanoi*'nin İspanya (Alonso vd 1988), Fas (Meknes ve Zerhoun Bölgesi) (Benjama vd 1993), Ürdün (Tehabsim vd 1991), Tunus (Boulila ve Mahjoub 1994), ABD-Kaliforniya (Teviotdale 1994), Portekiz (Fernandes 1994)'de mevcut olduğunu gözlemlenmiştir. Yunanistan'da yapılan çalışmalarda *Pss*'nin zakkum (*Nerium oleander*) ve yasemin (*Jasminum spp.*)'de doğal enfeksiyonlara sebep olduğu belirtilmiştir (Panagopoulos 1993). Hastalığın ABD'de fidanlıklarda önemli kayıplara neden olduğu (Azad ve Cooksey 1995), Portekiz'de de verim kayıplarına neden olduğu belirtilmektedir (Marcelo vd 1999).

Karaca (1977)'de hastalığın Karadeniz, Marmara, Ege, Akdeniz ve Güney Doğu Anadolu'da görüldüğünü ancak Ege ve Akdeniz bölgelerinde daha şiddetli olduğunu bildirmiştir. Türkiye'de bu hastalığın zeytinlerde varlığı uzun zamandır bilinmesine rağmen; ilk çalışmalar Ege Bölgesinde Azeri (1993), Batı Akdeniz Bölgesinde Basım ve Ersoy (2000), Ersoy (2002), Aydın ve Muğla illerinde Tatlı ve Benlioğlu (2004), Doğu Akdeniz Bölgesinde Mirik vd (2004), Güneydoğu Anadolu Bölgesinde Kavak ve Üstün (2009), Adana, Samsun ve Tekirdağ'da Mirik vd (2011) tarafından yapılmıştır.

Ülkemiz toprakları zeytin yetiştiriciliği bakımından hem ulusal olarak hem de uluslararası ölçülerde iklimsel ve coğrafik avantajından dolayı oldukça verimlidir. Ülkemizde zeytincilik tarım sektörünün önemli bir parçası olmakla birlikte üretim kapasitesini arttırmak için de yeni çalışmalara ihtiyaç duyan bir sektördür. Batı Akdeniz Bölgesi'nde yapılan gözlem ve çalışmalar sonucu Zeytin Dal Kanseri Antalya ili ve ilçelerinde (Manavgat, Serik, Aksu, Kaş, Kale, Döşemealtı) %80 oranında, Serik yöresinde, Edincik-su zeytin çeşidinde; %10 oranında, Kaş-Dalyan yöresinde, kan zeytini çeşidinde; diğer yörelerde ise %15-21 arasında değişen oranlarda tespit edilmiştir (Basım ve Ersoy 2000).

Braun vd (2001), fitopatogenik *Pseudomonas*'ların bitkilerde farklı belirtiler göstererek kanserler, geriye doğru ölümler, çiçek, sürgün, yaprak ya da çekirdekte yanıklıklar, yaprak lekeleri (*Pseudomonas syringae* patovarları), yumuşak ya da kahverengi çürüklükler (*P. viridiflava*, *P. marginalis* patovarları), tümör ya da urlar (*P. savastanoi* patovarları) ve mantar yanıklıkları (*P. tolaasii*, *P. agarici*) gibi hastalıklara neden olduğunu bildirmişlerdir. *Pseudomonas*'ların çoğunun bitkinin yeşil aksamında epifitik olarak bulunduğunu ya da rizosferde yer aldığını bu yüzden tek bir tanılama yönteminin yeterli olmayacağını; seçici besiyeri kullanımı, biyokimyasal/besinsel, patojenisite ve moleküler testlerin kombinasyon olarak uygulanmasını önermişlerdir.



Bununla birlikte birçok patojen *Pseudomonas*'ın tanısı basit birkaç test ile yapılabileceği bildirilmiştir.

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin biyokimyasal olarak testlenmesi için levan, oksidaz, patatestte yumusak çürüklük, arjinin dihidrolaz ve tütünde aşırı duyarlılık testlerini kapsayan LOPAT testleri yapılmaktadır. Ek olarak 37 °C'de gelişim, jelatin hidrolizi, eskulin, nitrat redüksiyon testi, indol oluşumu, karbon kaynaklarından yararlanma testleri uygulanmaktadır (Lelliot vd 1966).

Yapılan sınıflandırma çalışmalarında, 40'dan fazla biyokimyasal ve fizyolojik özellik strainler üzerinde denenmiş ve yapılan çalışmalarda bütün *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strainlerinin yaklaşık olarak aynı karakteristiğe sahip olduğu, önemli farklılıkların ise levan oluşumunda, IAA ve sitokin benzeri bileşiklerin üretiminde görüldüğü tespit edilmiştir. Bu bahsedilen iki madde dışbudaktan elde edilen izolatlar tarafından üretilmemekte ya da çok az miktarda üretilmekteyken, bu maddeler diğer konukçulardan elde edilen izolatlar tarafından daha fazla üretilmektedir. Yapılan testler sonucunda farklı konukçulardan elde edilen *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatları morfolojik, biyokimyasal ve serolojik olarak ayırt edilememiştir. Dışbudak ve diğer konukçu bitkiler arasındaki ayırım patojenisiteyle ilgili olan IAA ve sitokin maddelerinin üretimiyle yapılmaktadır. Bununla birlikte farklı konukçu bitkilerden elde edilen izolatlar farklı patojenisite ve farklı konukçu bitki dizilişi göstermektedirler. Aynı zamanda dış budaktan elde edilen izolatlar patojenisite testleri ile diğer konukçulardan elde edilen izolatlardan rahatlıkla ayırt edilebilmektedir. Bunun yanında konukçu spesifikliğine bir başka örnek olarak zakkum izolatlarının, zeytin bitkisinde ur oluşturmalarına rağmen, zeytin izolatlarının diğer konukçu bitkiler hariç zakkumda ur oluşturmadığı görülmüştür (Surico ve Iacobellis 1992).

Azad ve Cooksey (1995), zakkumdan izole edilen izolatların teşhisi için "Oleander Knot Agar" olarak adlandırdıkları OKA yarı seçici besi ortamını dizayn etmişlerdir. 38 farklı coğrafik bölgeden toplanmış *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatları OKA' da geliştirilmiş ve ortalama olarak %43.6 oranında bir başarı sağlanmıştır. OKA ortamı diğer ortamlarla karşılaştırıldığında saprofitik bakterilerin gelişimini %89–96,7 oranında engellendiği tespit edilmiştir. Diğer test edilen bitki patojeni bakterilerin % 44'ünün bu ortamda gelişme gösteremediği belirlenirken, % 13 ise az gelişme göstermiştir.

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin yapılan tanılama teknikleri içerisinde bakteriyel izolasyonlar, bunu takiben yapılan patojenisite testleri ve biyokimyasal veya serolojik testler bulunmaktadır. Bunlardan biri olan yarı seçici ortam kullanımı, *Pss*'nin izolasyonunu diğer bakterilerle olan karışık olduğu durumlarda kolaylaştırmaktadır. Yarı seçici besi ortamı olan PVF1 içerisinde; 10 ml glycerol, 30 g sukroz, 2.5 g Difco casamino acid, 1,96 g dipotassium phosphate trihydrate, 0,4 g magnesium sulfate heptahydrate, 0.4 g SDS, 16 g agar, 1 lt distile su bulunmaktadır. PVF1 seçiciliğine rağmen, Gram (-) başka bakteriler ortamda gelişebilmektedir. Ama bu bakteriler *Pss*'den UV ışığı altında floresan ışık verememeleriyle ayırt edilebilmektedir (Penyalver vd 2000).

PVF-1 ortamı genel olarak, bitki materyalleri örneklendiğinde yapraklarla bağlantılı saprofitik bakterilerin gelişimini %90 ve daha fazla engellemektedir. Zeytin ve zakkum bitkilerinden *Pss*'nin izolasyonunda PVF-1 ortamının kullanımıyla bakteri saf

kültür olarak elde edilebilmektedir. Normal olarak, *Pss* genç dokulardan izolasyonu, taze enfekteli bölgeler ele alındığında ve distile su ya da fosfat buffer içerisinde süspanسیون haline getirilerek küçük parçalarının petri kaplarına yayılmasıyla sağlanır. Diğer taraftan yaşlı çatlaklardaki gallerden *Pss*'nin izolasyonu, çok sayıda farklı özellikte teşhis edilmemiş sarı pigmentli bakterilerin varlığından ve hastalıklı dokulardaki canlı popülasyonunun azlığından dolayı zordur (Basım ve Ersoy 2000).

Farklı zeytin alanlarından toplanan hastalıklı bitki materyallerinden *Pss*'nin izolasyonunu yapmak için, dallar üzerinde oluşmuş olan urlar dallardan ayrılmıştır. Öncelikle grimsi yeşil tondaki urlar dikkate alınarak eğer alınan urların üst yapısı odunsuysa öncelikle bu odunsu dokunun üst sert tabakası kazınmıştır. Üst yüzeydeki sert tabaka kazınan urlar %96'lık alkole batırılarak kısa süre ile atesten geçirilmiş ve birkaç damla fosfat buffer ile steril porselen bir havan içinde iyice ezilerek 2-3 saat bekletilmiştir. Eğer doku yumuşaksa ur dokusunun yüzeyi alkolle silinerek ve yine birkaç damla steril fosfat buffer eklenerek porselen havan içinde ezilmiş ve 2-3 saat bekletilmiştir (Lelliot ve Stead 1987).

Yapılan izolasyon çalışmalarında urlu bölge ile birlikte sağlıklı bölgeden 0.5-1 cm ortalama büyüklüğe sahip parçalar kesilerek %70'lik etil alkol içerisinde 1-2 dakika süre ile bekletilmiştir. Kesilerek alkol içerisinde bekletilmiş bu parçalar 1-2 ml steril saf su kullanılarak, steril havan içerisinde ezilmiştir. İşlem sonucu elde edilen süspanسیونdan bir öze dolusu alınarak, çizgi ekim yöntemi kullanılarak besi ortamlarına ekim yapılmıştır. Besi ortamı olarak Surico ve Lavermicocca (1989)'nin belirttiği yöntem temel alınarak hazırlanan PVF-1 yarı seçici besi ortamı kullanılmıştır. Çizgi ekim yöntemi ile ekim yapılmış olan besi ortamları 24-48 saat inkübe edilmiş ve besi ortamında pozitif kontroller (Psv 19 ve Psv 1) ile benzerlik gösterenler seçilmiştir. Seçilen koloniler yavaş gelişen, 6 gün içerisinde düzgün, çapı 2-3 mm olan, grimsi-beyaz renkli, kenar kısımları hafif kabarık ve UV ışık altında soluk mavi floresans ışımaya gösteren kolonilerdir. Bu koloniler Nutrient Agar (NA) besi ortamlarına saflaştırılmıştır. Bu şekilde elde edilen izolatlar patojenisite testlerinde ve diğer çalışmalarda kullanmak amacıyla %15 glycerol ve Nutrient Broth (NB) içeren tüplerde -80°C'de stoğa alınmıştır (Tatlı ve Benlioğlu 2004).

Aydın ve Muğla illerinde ve çevre köylerinde yapılan çalışmada, bakteriyel izolasyonlar King's B ve PVF-1 besi ortamlarına yapılmıştır. Bu şekilde elde edilen izolatların patojenisite ve virülenslik testleri yapılmıştır. Yapılan testlerde 62 izolatın 58 tanesi zeytin dallarında, değişik boyutlarda, urlara neden olmuştur. Zakkum bitkisi üzerinde yapılan testler sonucu, sadece zakkum izolatlarının ura neden olduğu gözlenirken, zeytin izolatlarının ise zakkum üzerinde herhangi bir ur oluşumuna neden olmadığı gözlemlenmiştir. 58 izolattan 41 tanesi King's B besi ortamlarındaki inkübasyonu sonucunda UV ışık altında fluoresan pigment oluşturmuştur. Testlenen tüm izolatlar xyloz, sorbitol ve gliserol kullanmıştır. Yine tüm izolatlar tünde aşırı duyarlılık reaksiyonu vermiş fakat eskulin hidrolizi, nitrat redüksiyonu, arginin, jelatin, 37 °C'de gelişme, % 5 nutrient sakkaroz agar'da levan oluşturma, erythritol, indol ve trehaloz, sellobioz, raffinöz'dan yararlanma testlerinde negatif sonuç vermiştir. L-tartarik, Mesotartarat ve malonik asitten yararlanma testlerinde ise değişken sonuçlar elde edilmiştir. Bakteriosin üretimi zeytin izolatlarında gözlenirken zakkum izolatlarında ise gözlenmemiştir. 22 tane *Pseudomonas savastanoi* izolatının SDS-PAGE yöntemi ile tüm

protein içerikleri incelenmiş ve zeytin izolatlarının arasında bir farklılık tespit edilememiştir (Tatlı 2004).

Enfekteli ağaçlardan alınan örnekler steril havan içerisinde ezilmiş ve elde edilen sıvı bir öze ile alınarak SNA besi ortamına tek koloni çizim yöntemi ile ekim yapılmıştır. 27°C de 4 gün inkübasyondan sonra gelişen bakteri kolonilerinden küçük (1-3 mm), pürüzsüz, yükselteli, grimsi beyaz, kenarları sınırlanmış olanları *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* olarak değerlendirilmiştir. SNA besi ortamında gelişen bu koloniler King's B besi ortamına çizilmiş ve bakteri bu besi ortamında yeşil pigment oluşturmuştur. Ayrıca bu King's B ortamındaki bu koloniler UV ışık altında floresan ışımaya vermiştir (Surico ve Lavermicocca 1989, Krieg ve Holt 1984).

Patojenin virülensliği, ura ve tümöre sebep olması, enfekte edilen bitkinin yaşı ve bitkinin içinde bulunduğu periyodik dönem patojenin değerlendirilmesi açısından önemli etkenlerdir. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strainleri genel olarak zeytin ağaçları üzerinde yüksek virulenttir fakat belirli çeşitler ve strainler arasında farklı bağlantılar olduğu bulunmuştur. Patojenin yara çevresindeki etkisi belirli çeşitlerdeki hastalık şiddetini etkilemektedir. İkincil enfeksiyonlar sonucu oluşan tümörlerin, ilk enfeksiyondan etkilenmeyen yara dokuları üzerinde olduğu baskın bir düşüncedir. Yapılan çalışmalar sonucu Zeytin Dal Kanseri Hastalığına dayanıklı bir çeşit bulunamamıştır (Penyalver vd 2005).

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* konukçusu olan bitkilerin hücreleri arasında indol 3-asetik asit (IAA), zeatin, transzeatin ribozid gibi bitki büyüme hormonlarının salgılamasıyla ur oluşumuna sebep olmaktadır. *Pss* ur oluşumuna sebep olmakta fakat bunu yaparken *Agrobacterium tumefaciens*'te olduğu gibi herhangi bir DNA transferi yapmamaktadır (Panagopoulos 1993).

Zeytin ve zakkum bitkilerinde ur oluşumu, enfekteli dokular içerisinde yüksek miktarlarda patojenik bakteri tarafından oluşturulan indole-3-acetic acid (IAA) ve sitokinin üretimi ile yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir (Smidt ve Kosuge 1978, Comai vd 1982, Surico ve Iacobellis vd 1985).

Sitokinin üretimi urların gelişmesini etkilerken IAA üretimi hastalığın inkübasyon süresini kısaltır (Surico vd 1985). *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Indoleacetamide yoluyla L-tryptophan üzerinden IAA'ı oluşturur. IAA'nın sentezlenmesinde iki enzim görev almaktadır; 1) Tryptophan 2-monooxygenase enzimi, L-tryptophan'ı Indole acetamid'e dönüştürür 2) Indoleacetamide hydrolase enzimi, IAA, amonyumu oluşturur ve Indoleacetamide'in hidrolizini katalizler (Wilson 1965). Bu iki enzim için 2 farklı gen tanımlanmıştır. Tanımlanan genler *iaaM* ve *iaaH* genleridir (Comai ve Kosuge 1982). Bu genler, zeytinden izole edilen *Pss* strainlerinde kromozom üzerinde, zakkumdan izole edilen strainlerde ise plazmid üzerinde taşınırlar (Comai ve Kosuge 1980).

IAA üretimi ile *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin virülensliği arasında doğrudan ilişki vardır. *Pss*'nin virülensliğinin oluşumunda enzim tryptophan 2-monooxygenase merkez rol oynamakta ve bütün IAA operonun virülenslik için mutlak gerekli olduğunu göstermektedir. IAA ve zeytin yaprakları ile yapılan çalışmalarda,

simptom oluşumu ile IAA arasında direk ilişki olduğu ve *Pss*'ye doğaya seçicilik kazandırdığı görülmüştür (Surico ve Iacobellis 1992).

Patojenisite için mutlak gerekli olan IAA'nın sentezlenmesinden sorumlu olan iki gen (*iaaM* ve *iaaH*) ve *Agrobacterium tumefaciens*'in sebep olduğu kök uru hastalığının oluşmasında gerekli olan Ti plazmidi üzerinde bulunan *tms1* ve *tms2* genleri arasında homoloji vardır. Her iki patojen de ur oluşturabilmek için bu genlere gereksinim duyar fakat bu iki patojenin ur oluşturma mekanizmaları oldukça farklıdır (Powell ve Morris 1986).

Sisto vd. (1999), Willis vd (1991) patojen bakterilerin genomları üzerinde yer alan hipersensitif reaksiyon ve patojenisite genlerinin (*hrp*), konukçu olan bitki ve patojen bakteri arasındaki pozitif ilişkinin gerçekleşmesi için mutlak gerekli olduğunu bildirmişlerdir. *Hrp* genleri mutasyona uğratılmış bakteriler konukçusu olmayan bitkilerde ve hassas olan konukçularının dayanıklı çeşitlerinde hipersensitif reaksiyon meydana getirememişlerdir. Willis vd. (1991), Bonas (1994), Sisto vd (1999), *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Xanthomonas* ve *Ralstonia* gibi genelde konukçuları üzerinde nekrotik simptomlar oluşturan bitki patojeni bakteri cinlerinin *hrp* genlerini genomları üzerinde bulduklarını belirlemişlerdir.

Hassas iki zeytin çeşidi Arbequina ve Picudo üzerinde 4 yıl süren bir ilaç denemesi yapılmıştır. Bakır oksiklorür, Bakırkalsik sülfat + Mancozeb ve Asibenzoler-S-metil'in Zeytin Dal Kanseri Hastalığının ortaya çıkışı ve *Pss* popülasyonu üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Her iki Bakır uygulaması sonucu *Pss*'nin izole edilme oranı azalmıştır. Asibenzoler-S-metil uygulamasının ise *Pss* popülasyonunda veya hastalık oluşumunda bir etkisi gözlemlenmemiştir. Üç yılda, 5 Bakır uygulaması yapılan bitkilerde hastalık oluşumu, Bakır uygulanmayan bitkilere göre oldukça düşük miktarda gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, Bakır uygulamalarının Zeytin Dal Kanseri hastalığının özellikle yüksek yoğunluklu bahçelerde, entegre bir kontrol programı kapsamında düzenli olarak gerçekleştirilmesi gerektiğini ortaya koymuştur (Quesada vd 2010).

İspanya Dünya Zeytin Gen Bankası'ndan alınan zeytin çeşitleri ile yapılan çalışmada zeytin fidanlarının farklı bölgelerine ve farklı dozlarda bulaştırmalar yapılmıştır. Bazı çeşitlerde uygulanan *Pss* dozu ile hastalık şiddeti arasında pozitif bir bağlantı görülmüştür. Bulaştırmanın yapılmadığı bölgelerde görülen ikincil urlar, *Pss*'nin zeytin fidanları üzerindeki hareketini göstermiştir. Zeytin çeşitlerinin hassaslıkları arasında farklar gözlemlenmiş fakat *Pss*'ye dayanıklı bir çeşit bulunamamıştır (Penyalver vd 2006).

Marchi vd (2009), *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin zeytin ağaçları içerisinde yayılmasına yönelik histolojik çalışmalar yapmışlardır. Araştırmalarına göre *Pss* ve zeytin bitkileri arasındaki etkileşimin, yüksek oranda ur oluşumuyla sonuçlandığını bildirmişlerdir. Histolojik çalışmalarının sonuçlarına göre bakteriyel patojen *Pss*, bitki içerisinde ksilem boruları boyunca lokalize olmakta ve sistemik bir yayılım göstermektedir. Bitkinin farklı bölgelerine bu yolla taşınarak, sekonder enfeksiyonlar meydana getirmektedir.

Patojen bakteri *Pss*, oluşturduğu urlar içerisinde yaşamını sürdürmekte ve çoğalmaktadır. *Pss* yağmurlu dönemlerde yıkanmanın etkisiyle dışarı çıkmakta ve bitki

üzerinde diğer kısımlara taşınmaktadır. Yağmurlu periyotlarda, yüksek nemin de etkisiyle ur oluşumu teşvik edilmektedir (Panagopoulos 1993; Teviotdale 1994). Genç urlar açık yeşil renkte iken, yaşlı urlar genellikle giderek koyu renk almakta ve pürüzlü, kaba bir görünüme sahip olmaktadır. Genç urların iç kısmı yaşlı urlara göre oldukça yumşak yapıda olup süngerimsidir. Bu yapı içerisinde parlak, yapışkan ve sulu bakteri keseleri bulunmaktadır. Zeytin meyvesi üzerinde meydana gelen enfeksiyonlar dairesel, 0.5-3 mm çapında, koyu kahverengi lekeler, lentisellerden başlayan siyahlaşmalar ve doku içerisine batık bir görünüme sahiptir. Kahverengi, siyah lekeler zaman içerisinde birleşerek daha geniş lezyonlara sebep olabilmektedir. Yukarıda anlatılan simptomlar ilk kez 'Zachos' tarafından Yunanistan'da tarif edilmiştir (Panagopoulos 1993).

Yeni enfeksiyonlar için inokulum kaynağı genç tümörlerde yaşayan *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* popülasyonu tarafından sağlanır ama aynı zamanda *Pss* doğal olarak sağlıklı zeytin ağaçlarında yaprak yüzeyinde, dal yüzeyinde, gövdede ve meyvede epifitik olarak bulunmaktadır. *Pss*'nin epifitik popülasyonu yeni enfeksiyonlar için önemli bir inokulum kaynağı olup, yoğunluğu; sezona, ağacın yaşına, hava koşullarına ve bölgelere göre değişiklik göstermektedir (Ercolani 1978).

Quesada vd (2010), *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin epifitik popülasyonu üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Çalışma kapsamında 4 yıldan fazla bir süre boyunca *Pss* inokule edilmemiş bitkiler ile urlar vasıtasıyla inokulasyon yapılmış bitkiler karşılaştırılmıştır. İnokulasyon yapılmış bitkilerde ve kontrol olarak seçilen bitkilerde hastalık şiddeti ölçülmüştür. Hastalık şiddeti *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* inokule edilmiş ağaçlarda yüksek bulunurken; epifitik popülasyon geçişi *Pss* inokulasyonu yapılmış bitkilerden, inokulasyon yapılmamış bitkilere doğru olmuştur. Çalışma sonucunda Zeytin Dal Kanseri hastalığı şiddeti yüksek seviyelere ulaşmıştır. *Pss* inokule edilmemiş bitkilerden izole edilen epifitik popülasyon moleküler karakterizasyon çalışmaları sonucunda, *Pss* inokule edilmiş bitkilerdeki popülasyonla aynı olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, zeytin ağaçları üzerinde epifitik olarak bulunan *Pss*'nin, kısa mesafelere hareket ettiği ve epifitik *Pss*'nin varlığıyla ağaçlardaki ur sayısı arasında bağlantı olduğu belirtilmiştir.

Bitkilerin kambiyum tabakasının aktif olduğu ve *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* popülasyonunun yüksek olduğu periyotlarda, ilkbahar donları etkisiyle yaralanan bitkilerde hastalık şiddeti artmaktadır. *Pss* yıl boyunca aktif olmasa dahi yaprak yüzeylerinde epifitik olarak bulunabilmektedir. Araştırmalar sonucu *Pss*'nin symptom göstermeyen yapraklar üzerindeki sayısının tek bitkide var olan hastalıkla ilgili olmadığı görülmüştür. Epifitik popülasyonun sayısının ilkbahar ve sonbahar mevsimlerinde arttığı, yaz ve kış dönemlerinde ise daha düşük yoğunlukta olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar *Pss*'nin özellikle bu mevsimler süresince önemli bir inokulum kaynağı olduğunu desteklemiştir. Yabani tip strainler zeytin bitkileri üzerinde kolayca çoğalabilirken, IAA eksik mutantların çoğalmaları, yapraklara yapılan inokulasyondan son neredeyse hiç gözlemlenmemiştir. Bu doğrultuda IAA üretiminin *Pss*'nin hastalık oluşturmada gerekliliğinin yanında, *Pss*'nin epifitik canlılığıyla da ilişkisi olduğu desteklenmiştir (Varvaro ve Surico 1984).

Ercolani (1993), zeytin bitkisi üzerindeki urlardan ve zeytin yapraklarından *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*'leri elde etmiş ve elde ettiği bu izolatların karşılaştırmasını yapmıştır. 20 zeytin bitkisinden, 25 ur ve 100 adet yapraktan patojeni

izole etmiştir. 60 farklı karakter kullanarak numaratik analizler yapmış ve sonuçta 6 aylık zeytin bitkileri üzerindeki urlardan Ekim ve Nisan aylarında izole ettiği izolatlar arasında benzerlik bulmuştur. Bulduğu bu benzerlik Nisan ve Ekim aylarında, yapraklardan elde ettiği izolatlar arasındaki benzerlikten daha fazla çıkmıştır.

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin zeytin ağacının dallarında ve diğer toprak üstü aksamında oluşturduğu urların iç kısmı sadece *Pss* için değil *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Erwinia* ve *Curtobacterium* cinslerine bağlı bir çok tür için iyi bir yaşam ortamıdır. Urlar içerinden sıklıkla patojenik olmayan *Erwinia toletana* (Da Silva vd 2013), *Pantoea agglomerans* (Moretti vd 2014), ve *Erwinia oleae* (Moretti vd 2014) türleri izole edilebilir. Patojenik olmayan bu türler hastalık şiddetinin değişmesinde *Pss* ile işbirliği yapar. *Pss*'nin tek başına inokule edilmesiyle oluşan urların, bu türlerle birlikte yapılan inokulasyona göre daha küçük olduğu gözlemlenmiştir. Patojenik olmayan bu bakteriler çeşitli metabolitlerin değişiminde ve quorum sensing sinyallerinin aktarılmasında yardımcıdır.

Marchi vd. (2006), Zeytin Dal Kanseri hastalığı üzerinde yaptığı sorvey çalışmalarında elde ettikleri urların %70'inde *Pantoea agglomerans* ile *Pseudomonas savastanoi* pv.*savastanoi* arasında pozitif bir ilişki belirlemişlerdir. Patojenisite çalışmaları için 1 yaşındaki zeytin bitkilerinin gövdelerine bu iki bakteri inokule edilmiştir ve çalışma sonucu *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* popülasyonlarının, *P. agglomerans*'ın popülasyonlarının gelişimini desteklediği görülmüştür. *P. agglomerans* popülasyonlarının inokulasyon bölgesindeki baskın gelişimi ise yer, besin rekabeti ve *P. agglomerans*'ın antibiyotik üretimi nedeniyle *Pss* gelişimini baskı altına almıştır. Sitokinin üretmeyen *P. agglomerans*'ın ürettiği IAA'nın ise, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin oluşturduğu urların boyutunu küçülttüğünü belirlemişlerdir.

Zeytin Dal Kanseri hastalığının mücadelesinde, diğer bakteriyel hastalıklarda olduğu gibi kimyasal kullanımı sınırlı olduğu için, kültürel mücadele yöntemleri çok önemlidir. Bu amaç doğrultusunda; yaralanmaları engellemek amacıyla don riskinin olduğu yerlere bahçe tesisinden kaçınılmalı, taban suyunun yüksek olmasından kaçınılmalıdır. Fazla suyu uzaklaştırmak için kurutma kuyuları açılmalıdır. Zeytin fidanlarının bulaşık olmamasına dikkat edilmeli, fazla azotlu gübrelemeden uzak durulmalı, diğer bitki besin elementleri de uygun programlar dahilinde uygulanmalıdır. Hasat sırasında oluşabilecek yaralanmalardan kaçınmak için sıklıkla hasat yapılmamalıdır. Budama işlemlerinde kullanılan aletlerinin dezenfeksiyonuna dikkat edilmeli, bu aletler % 1'lik sodyumhipklorit (NaOH) ile muamele edilmelidir. Nemli günlerde budama yapılmamalıdır. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin yara patojeni olduğu unutulmamalı ve olabilecek bütün yaralanmalardan kaçınılmalıdır. Yapılacak kültürel işlemlere her zaman sağlıklı bitkilerden başlanmalıdır. Bakır içerikli preparatlar hastalığın yayılmasını azaltacağı ve koruma sağlayacağı için, *Pss* popülasyonunun yüksek olduğu ilkbahar döneminde ve hasat sonrası dönemde uygulanmalıdır (Ramos vd 2012).

Zeytin Dal Kanseri etmeni *Pss* için antibiyotik kullanımı, bitkinin hassas olduğu evrede çok fazla sayıda deneme gerektireceği için ekonomik olarak yapılamamaktadır. Bu sebeple Zeytin Dal Kanseri ile mücadelede kültürel önlemler önem kazanmaktadır. Zeytin ağaçlarının yaralanmasını engellemek, eğer mümkünse hasatı elle yapmak, temiz üretim materyali kullanmak, bahçe tesis edilecek alanı doğru seçmek alınabilecek

önlemler arasındadır. Patojenin zeytin bitkileri arasında taşınmasını engellemek amacıyla budama aletlerini dezenfekte ederek kullanmak gerekmektedir (Çavuşoğlu ve Çakır 1998).

Bakırlı preparatlar sistemik olmayan enfeksiyonlarda sonuca ulaşırken, bitki iletim demetlerinde kolonize olmuş veya bitki içerisinde bulunan bakteriyel patojenleri engellemede etkili olamamaktadır. Bu amaçla biyolojik mücadele, farklı uçucu yağların etkilerinin denenmesi gibi yöntemler araştırılmaktadır (Oksel 2014). Krid vd (2011), zeytin alt suyunu *Pss*'ye karşı *in vitro*'da denemişlerdir. Petri kaplarında gerçekleştirilen bu denemede zeytin alt suyunun *Pss* gelişimini engellediğini bildirmişlerdir.

*Pistacia* ve *Schinus* türlerinden elde edilen yaprak özütleri, içerisinde *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin de bulunduğu farklı bitki patojeni bakterilere karşı denenmiştir. Deneme sonucunda *Pistacia* türlerinin antibakteriyel etkisi tespit edilirken, *Schinus* türlerinin ise antifungal etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Rhouma vd 2009).

Zakkum ve zeytin izolatları ile yapılan çalışmada indol-3-acetic acid ve sitokin sentezinden sorumlu *iaaM* (tryptophan monooxygenase) ile *ipt* (isopentenyl transferase) genlerinin plazmid veya kromozom üzerinde bulunma yerleri araştırılmıştır. Kullanılan 10 zakkum izolatu zeytin ve zakkumda ur oluştururken, bakteriosin üretmemiştir. Bu 10 izolatu plazmit üzerinde *iaaM* (tryptophan monooxygenase) genini bulundurmadığı belirlenmiştir. Kullanılan 11 zeytin izolatu sadece zeytin bitkilerinde ur oluşturmuştur. 11 zeytin izolatından 10 izolat bakteriosin üretmiş ve 9 izolatu ise kromozomu üzerinde *iaaM* geni taşıdığı saptanmıştır. Zeytin izolatlarından 1 tanesi aynı plazmit üzerinde *iaaM* ve *ipt* genini bulundurduğu, 2 zeytin izolatının ise plazmit üzerinde *iaaM* geni bulundurduğu saptanmıştır. Bakteriosin üreten ve virulens olan zeytin izolatlarında, plazmit üzerinde bulunan *iaaM* geni ile *ipt* geni aynı plazmit üzerinde belirlenmiştir. Virulenslikte gerekli olan *iaaM* ve *ipt* genlerinin kromozom üzerinde ya da plazmit üzerinde bulunabileceği tespit edilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, zeytin ve zakkum bitkilerinin birlikte bulunması durumunda dahi hastalığın bitkiler arasında bulaşması gerçekleşmemektedir (Caponero vd 1995).

Özellikle 1980'li yıllardan başlayarak nükleik asit karakterizasyonu, rekombinant teknolojisi, sekans analizi, moleküler klonlama ve genetik alandaki çalışmalar, nükleik asit temelli problemlardan yararlanma olanakları ile birlikte giderek artış göstermiştir. Bunların yanında ökaryotik ve prokaryotiklerin genomları üzerindeki modifiye çalışmaları, restriksiyon analizleri üzerinde de son zamanlarda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. 1985 yılında Saiki ve arkadaşları DNA veya RNA baz sıralarının amplifiye edilebilmesi (sayısal olarak çoğaltılması) teknolojisine dayanan Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nu (PCR) geliştirmişlerdir. PCR'ın geliştirilmesi, moleküler teknoloji alanındaki çalışmalara öncü olmuş ve aynı zamanda bu teknolojinin kullanım alanının da giderek genişlemesinin yolunu açmıştır. PCR son yıllarda enfeksiyona sebep olan etmenlerin teşhis edilmesinde, epidemiyolojide, genetik kaynaklı bozuklukların saptanmasında ve diğer alanlarda da geniş bir uygulama sahası bulmuştur. PCR, izole edilmiş veya patolojik materyallerde var olan hedef genetik materyallerin (DNA veya RNA) spesifik kısa zincirli oligonükleotit primerler yardımı ile enzimatik olarak sayısal amplifikasyondur. Seçilmiş olan hedef genetik materyal çok az sayıda ve hatta birçok hedef dışı DNA'lar arasında olsa bile, spesifik primerler yardımı ile çoğaltılabilir ve homojen bir DNA materyali haline getirebilir. Bu sayede hedef DNA kolayca teşhis

edilebilir. PCR solüsyonu, hedef DNA sekansları, forward ve reverse spesifik oligonükleotid primerler (15–25 bazlık tek iplikçikli), DNA polimeraz enzimi (*Taq* polimeraz) ve dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) olarak hazırlandıktan sonra, hedef DNA'nın sıcaklık ile denetürasyonu, primerlerin hedef bölgeye bağlanması, polimerizasyonun gerçekleşmesi, amplifiye edilmiş ürünlerin saptanması aşamaları ile tanı işlemi gerçekleştirilmektedir (Arda 1994).

Tek bir saf koloniden alınarak 48 saat boyunca NA (Nutrient Agar) besi yerinde inkübe edilmiş hücrelerden bir kısmı steril tuz solüsyonu ile karıştırılıp, 12000 g'de 2 dk'ka santrifüj edilmiştir. Çökelti uzaklaştırılmış ve elde edilen pellet 1-2 x 10<sup>8</sup> cfu/ml'ye karşılık optik yoğunluktaki steril salin içerisinde çözülmüştür. Oluşan süspansiyon kaynar suda 10 dakika ısıtılmış ve -20 °C'de saklanmıştır. Louws vd (1994), tarafından tekrarlı PCR (rep-PCR) yöntemi kullanılmıştır. İtalya'nın farklı bölgelerinde yetiştirilmiş, farklı zeytin kültürlerinden izole edilen *Pss* izolatlarının DNA parmak izleri ERIC, BOX ve REP primer setleriyle tespit edilmeye çalışılmıştır. Tekrarlanabilen PCR profilleri 100-1500 baz dizisi aralığında değişken bantları içermektedir. REP primerleri kullanılarak belirgin şekilde seçilebilir ve tekrarlanabilir bantlar elde edilmiştir. ERIC ve BOX primerlerinden elde edilen REP primerleri, en fazla ayırık bant veren grup olmuştur (Louws vd 1994).

Geçmişten günümüze kullanılmakta olan klasik tanılama metotlarına göre daha kolay, daha hızlı ve güvenilir sonuçlar veren moleküler yöntemler sayesinde patojenik bakterilerin teşhisi çok daha güvenilir ve hızlı bir şekilde yapılabilmektedir. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin tanısı için *iaaL* gen bölgesi üzerinden dizayn edilen primerler IAALF 5'-GGC ACC AGC GGC AAC ATC AA-3' ve IAALR 5'-CGC CCT CGC AAC TGC CAT AC-3' tasarlanmıştır. Tasarlanan primerler PCR tekniği kullanılarak amplifiye edilmiştir (Penyalver vd 2000).

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin klasik PCR yöntemi ile tanılması Penyalver vd'nin (2000), *Pss*'nin *iaaL* gen dizisi kullanarak elde ettikleri primer (IAALF 5'-GGC ACC AGC GGC AAC ATC AA-3' VE IAALR 5'-CGC CCT CGC AAC TGC CAT AC-3') ile başarılı bir şekilde yapılmıştır. Klasik PCR işlemi sonucunda 454 kb'lik bant oluşumu gözlenmektedir.

Basım ve Ersoy (2002) tarafından dizayn edilen PSS1 (5'-TGG GGT GCT ACT TGT ACC CGA-3') ve PSS2 (5'- CCG TGT ACT ACG TTC AGC GAG-3') ile yapılan PCR sonucunda 684 bp bant görüntüsü elde edilmiştir. Aynı şekilde dizayn ettikleri PSS3 (5'-CAG GAC TTC AGA ACC CAC GT-3') ve PSS4 (5'-CGG TCG ATG ATG TAG AGC AT-3') primerleri kullanılarak yaptıkları PCR işlemleri sonucunda da 1064 bp'lik bant oluşumunu elde etmişlerdir. Bu çalışmada hem PSS1-PSS2 hem de PSS3-PSS4 primer çiftleri kullanarak *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin klasik PCR ile tanılanmasının başarılı bir şekilde yapılacağı gösterilmiştir.

Bertolini vd (2003), "Nested PCR" yöntemini kullanılarak *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin tespitini yapmışlardır. Dot-Blot hibridizasyon yöntemi ile Nested PCR yöntemini birleştirtirmişler ve zeytin özütlerinin 1 ml'sinde bir hücre tespit edebilmişlerdir. Klasik PCR yöntemi ve diğer teknikler kullanıldığında örneklerin 50'sinde *Pss* tespit edilirken, Nested PCR yöntemi ile 82 örnekte *Pss* tespit edebilmişlerdir. Bu sonuç doğrultusunda, daha önceden rapor edilen tanı-tespit



yöntemlerine göre, uygulanan yöntemin çok daha fazla hassasiyete sahip olduğunu belirlemişlerdir.

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin klasik PCR ile tanısında, spesifik hrcC2F 5'-GACCGGCTTGGTCAGGAAT-3' ve hrcC2R 5'-CGGCTTTTCCCGGATTTCT-3' oligonükleotid primerleri tasarlanmıştır. Tasarlanan primerler kullanılarak klasik PCR ile 593 bp'lik DNA fragmentinin amplifikasyonu başarılı bir şekilde sağlanmıştır (Sisto vd 2004).

Bella vd (2003), çeşitli tanılama yöntemlerini karşılaştırmak için PVF-1 ortamına izolasyon, klasik PCR ve Real-Time PCR yöntemlerini kullanmışlardır. Bu amaçla doğal enfekteli zakkum bitkilerinden simptomlu ve simptomsuz 20 örnek almışlardır. Alınan simptomlu 20 örnekten PVF-1 besi ortamına izolasyon ve klasik PCR yöntemi ile 18 tanesinde Zeytin Dal Kanseri hastalık etmeni *Pss*'yi belirlemişlerdir. Enfekteli olan fakat ur oluşumu gözlemlenmeyen, simptomsuz zakkum bitkileri ile yapılan izolasyon ve klasik PCR çalışmalarında 6 adet örnekte, Real-Time PCR çalışmalarında ise 12 adet örnekte *Pss* tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda kullandıkları Real-Time PCR programı ile  $10^2$ - $10^8$  bakteri yoğunluğunda etmenin tanınabildiğini bildirmişlerdir.

Krid vd (2009), Tunus içerisinde yaptıkları sörvey çalışmalarında 58 adet, dünya genelinde yaptıkları çalışmalarda ise 21 adet *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatu elde etmişlerdir. Elde edilen bu izolatların genetik ayrımını RAPD DNA metodu ile çalışmışlardır. Topladıkları izolatları 3 gruba ayırmışlardır; 1.grup Avrupa izolatları ve Tunus'un güneyinden toplanan izolatlar, 2.grup Tunus'un kuzeyinden toplanan izolatlar, 3.grubu ise Tunus merkezden alınan izolatlar olarak belirlemişlerdir.

Servi (2009), Aydın ilindeki dokuz ilçede (Bozdoğan, Buharkent, Söke, Koçarlı, Çine, Karpuzlu, Nazilli, Karacasu, Kuyucak) *Pss*'nin çeşitli yöntemlerle tanılanmasını çalışmıştır. Çalışma kapsamında PVF-1 ve King's B besiyerlerinde gelişim, 37°C' de gelişim, esculin hidrolizi, pektolitik aktivite testi, , oksidaz testi, arginine dehidrolaz testi, , jelatinin hidrolizi, nitrat redüksiyonu, erythritol, mannitol, sorbitol ve sakkaroz kullanımı, üreaz aktivitesi, nitrat indirgenmesi, yumurta sarısı testi, nitrat indirgenmesi, D-arabinoz, IAA üretimi, Tütünde Aşırı Duyarlılık Reaksiyonu testlerini uygulamıştır. Aynı zamanda patojenin moleküler tanısı için klasik PCR tekniği ile *hrc* ve *iaaL* gen dizilerinin belirli bölgelerini çoğaltmıştır. İzolatların patojenisite testleri için zeytin ve zakkum fidanlarının sürgünlerini kullanmıştır. Patojenisite testleri sonucunda, 6 izolat hariç, tüm izolatların ur oluşturma yeteneği olduğunu gözlemlemiştir. Biyokimyasal ve moleküler yöntemler kullanılarak yapılan testler sonucunda, dokuz ilçeden elde edilen 125 bakteriyel izolatın 85'ini *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* olarak tanılamıştır.

Mirik ve Aysan (2011), Tekirdağ, Balıkesir, Yalova, Çanakkale ve Bursa illerinde zeytin bahçelerine sörveyler düzenleyerek izolatlar elde etmişlerdir. Elde edilen izolatları klasik yöntemlerle *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* olarak tanılamışlar ve aynı zaman bu izolatların klasik PCR, BIOLOG ve yağ asit analizlerini yapmışlardır. *Pss* izolatlarının tüm hücre yağ asit kompozisyonlarını karşılaştırmışlar ve %97 benzerlik bulmuşlardır. BOX-PCR temelli küme analizleri sonucunda *Pss* izolatlarının %97.4 oranında birbirine benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Zeytin Dal Kanseri hastalığının sörvey yapılan alanlardaki yaygınlık oranını ise, Tekirdağ'da %66, Balıkesir'de %81, Çanakkale'de %100, Bursa'da %4, olarak saptamışlar fakat Yalova'da

Zeytin Dal Kanseri hastalığına rastlamamışlardır. Zeytin Dal Kanseri hastalığının bahçe içindeki bulunuş oranlarını ise Tekirdağ'da %30, Balıkesir'de %56, Çanakkale'de %73, Bursa'da %0.6 olarak tespit etmişlerdir.

Servi (2012), Gaziantep, Kilis ve Kahramanmaraş'ta 2010 yılında yaptığı sörveylerde urlu bitkilerden izolatlar elde etmiştir. Bu izolatların tanısını morfolojik, biyokimyasal, Biolog sistemi ve klasik PCR ile yapmıştır. Yapılan sörveylere göre zeytin bahçelerinin Zeytin Dal Kanseri ile bulaşıklık oranını Nizip, Oğuzeli, Uluyol ilçelerinde %100, Kilis ve Merkez ilçesinde %80, Kahramanmaraş'ta ise %85 olarak belirlemiştir.

Son dönemde nükleik asit hibridizasyonuna dayalı moleküler yöntemler klasik yöntemlere göre oldukça hızlı ve güvenilir olmasından dolayı önem kazanmaktadır. Nükleik asit temelli yöntemler, dizisi belirli bir DNA bölgesinin *in vitro* olarak amplifiye edilmesine ve DNA molekülünün kısa zamanda ve çok miktarda kopyalanmasına olanak sağlayan tekniklerdir (Saiki vd 1985). Nükleik asit temelli teknikler hedef DNA dizisini çoğaltarak, bir patojenin tespiti çok daha kısa sürelerde ve diğer yöntemlere göre oldukça kesin bir şekilde yapılabilmektedir. Teknolojinin giderek gelişmesi ile birlikte PCR sıcaklık döngülerini sağlamak için kullanılan cihazların hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, Real-Time PCR yönteminin gelişmesini sağlamıştır. Real-Time PCR'da oluşan DNA kopyalarının değerlendirilmesi reaksiyon esnasında eş zamanlı olarak yapılabilmektedir. Bu teknoloji sayesinde reaksiyon süresince oluşan ürünlerin düzeyleri sayısal değerlere dönüştürerek ölçmek, eş zamanlı olarak reaksiyonun seyirine müdahale edebilmek ve PCR döngülerinin sayı ve sürelerini de değiştirebilmek mümkündür (Huletsky vd 2004, Qin vd 2003). Real-Time PCR'da, agaroz jel elektroforezi, DNA fragmentlerinin kanserojen bir kimyasal olan Ethidium Bromide ile boyanmasına ve UV ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına ihtiyaç kalmamaktadır. Bu da yöntemin daha hızlı, güvenilir, kesin ve kolay bir şekilde tamamlanmasına olanak sağlamaktadır. Real-Time PCR yönteminin avantajları arasında tanı ve tespitin hızlı, güvenilir ve hassas bir şekilde gerçekleştirilebilmesinin yanında direkt hastalıklı bitki dokularından tespit yapılabilmesi ve patojenlerin kantitatif olarak tespit edebilmesi gibi avantajları da Real-Time PCR yönteminin araştırmacılar tarafından giderek daha fazla kullanımına katkı sağlamaktadır.

Real-Time PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan (SYBR Green vb.) ya da diziye özgün problemlerden faydalanılmaktadır. Teknolojinin gelişmesi ile birlikte Real-Time PCR yöntemi için farklı prob sistemleri de geliştirilmiş ve kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde kullanılmaya başlanan en gelişmiş ve en ileri prob sistemlerinden biri LNA (Locked Nucleic Acid) adı verilen prob sistemidir. LNA prob sisteminde, prob üzerinde yer alan DNA analogu, monomerler üzerinde bulunan şeker halkaları ile metilen bir köprü ile bağlanmıştır. Bu sayede monomerlerin her biri spesifik bağlanma için en uygun atom şekli olan N konformasyonunda sabit kalabilmektedirler. Bu sayede, spesifik olmayan bağlanmalara izin vermemekte, problemlerin spesifik bölgelere olan bağlanma ihtimallerini arttırmakta ve gerçekleşen spesifik bağlanmaların daha kararlı ve düzgün olmasını sağlamaktadır. LNA problemlere ait diziler, Real-Time PCR'da kullanılan diğer problemlerin dizilerinden uzunluk olarak daha kısadır. Bu sayede prob dizisinin kendi içinde bağlanması ihtimalini ortadan kaldırmakta ve amplifikasyonların daha kısa sürede ve spesifik olarak gerçekleşmesine imkan tanımaktadır. LNA (Locked Nucleic Acid) probun kimyasal yapısı Real-Time

PCR yönteminin daha spesifik olarak çalışılmasını ve alınan sonuçların daha hızlı ve güvenilir olmasını sağlamaktadır (Anonim 2014-b).

Schaad ve Frederick (2002), zeytinden turunçgillere kadar birçok bitki üzerinde kayıplara sebep olan *Xylella fastidiosa*'nın Güney Amerika'da ve Kaliforniya'da neden olduğu kayıplar sebebiyle Real-Time PCR yöntemi ile tanı ve tespitini yapmışlardır. Kullanılan konvensiyonel yöntemlere göre, Real-Time PCR yönteminin bitki patojeni bakteri, fungus ve viruslarda daha spesifik olduğunu belirtmişlerdir. Çalışma kapsamında Real-Time PCR yönteminin avantaj ve dezavantajlarını tartışmışlardır. Yöntemin avantajlarını, klasik PCR yöntemine göre  $10^7$  kat daha hassas olması, sonuçların eş zamanlı değerlendirilmesi ile bulaşma riskinin azalması, jel elektroforezine ihtiyaç duymaması, hızlı sonuç vermesi olarak sıralamışlardır.

Li vd (2004), transgenik buğday bitkilerine aktarılan genin tespitini yapmak amacıyla Kantitatif Real-Time PCR yöntemini kullanmışlardır. Yöntem dahilinde kantitatif sonuçların elde edilmesinde referans (housekeeping) gen olarak puroindoline-b kullanılmışlardır. Çoklu örnekler üzerinde rahatça çalışabilen Real-Time PCR sayesinde kısa sürede, kesin sonuçlar elde etmişlerdir.

Atallah ve Stevenson (2006), patateste patojen olan fungal hastalık etmenleri *Phytophthora erythroseptica*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium sambucinum*, *Phytophthora infestans* ve bakteriyel patojen *Erwinia carotovora*'nın tanısını yapmak amacıyla Real-Time PCR yöntemini geliştirmişlerdir. Etmenlerin patojenisitinden sorumlu gen dizileri referans alınarak tasarladıkları primerler ve SYBR Green I boya kullanarak tanı çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Çalışma kapsamında patates yumrularında hastalığa sebep olan patojenlerin tespitinde Real-Time PCR yönteminin kullanılabilirliğini göstermeyi hedeflemişlerdir.

Berg vd (2006), lahanagillerde oldukça yüksek miktarlarda ürün ve kalite kayıplarına sebep olan bakteriyel etmen *Xanthomonas campestris*'in tespitini yapmak amacıyla multipleks Real-Time PCR yöntemini geliştirmişlerdir. Primer dizaynı için *Xanthomonas campestris*'in *hrpF* genine ve *Brassica* spp.'deki 18S–25S ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgesine göre primer seti ve prob dizayn edilmişlerdir. Hedef bölgede DLH151 ve DLH152 primerleri 77 bp'lik, DLH153 ve DHL154 primerleri ise 78 bp'lik bir kısmı çoğaltmış, prob olarak P7 (FAM-boya olarak BHQ1) kullanmışlardır. *Brassica* spp. için 100 bp'lik kısmı amplifiye etmede DLH155 ve DLH156 primer setini ve P8 probu (JOE-boya olarak BHQ1) kullanmışlardır.

Basım ve Basım (2007), fide evresindeki bitkilerde önemli kayıplara sebep olan tohum kökenli Domates Bakteriyel Benek hastalık etmeni *Pseudomonas tomato* (*syringae*) pv. *tomato*'nun tanı ve tespitini yapmak amacıyla, etmene özgün primer seti ve prob dizayn etmişlerdir. Dizayn edilen primer seti ve prob kullanılarak direkt bakteriyel hücreden, hastalıklı bitki dokularından ve tohumdan bakteriyel patojenin tanı ve tespitini Real-Time PCR ve Real-Time Bio-PCR yöntemleri ile yapılabildiğini ortaya koymuşlardır.

Hren vd (2007), asmalarda zarar yapan fitoplazmalardan *Flavesence bois* ve *Flavesence doree*'nin tanısını spesifik primer setleri ve TaqMan prob kullanarak Real-

Time PCR'da yapmışlardır. Bu sayede Real-Time PCR yönteminin fitoplazmaların tanısında hassas ve hızlı bir şekilde kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır.

Dreo vd (2007), bağ alanlarında görülen Bakteriyel Yanıklık hastalık etmeni *Xylophilus ampelinus*'un tanısı için Real-Time PCR yöntemini kullanmışlardır. Yöntem dahilinde MGB prob ve *X. ampelinus* için dizayn edilen primerleri kullanmışlardır. Çalışma içerisinde önce primer seti ve probun bakteriyel patojene spesifik olduğunu belirlemişler ve hassasiyet çalışmasını yapmışlardır. *X. Ampelinus*'e ait stok solüsyondan  $10^{-1}$ 'den  $10^{-8}$ 'e kadar seyreltmeler hazırlamışlar, hazırladıkları seyreltmeleri Nested PCR ve Real-Time PCR' da test etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre Real-Time PCR yönteminin Nested PCR'a benzer bir hassasiyette çalıştığını belirlemişlerdir. Bitki materyallerinden tespit için yapılan çalışmada ise enfekteli kök, gövde ve yapraklardan hazırlanan solüsyonların tüm seyreltmelerinde Real-Time PCR yönteminde patojenin tespiti yapılırken, Nested PCR ile bazı seyreltmelerde patojen tespit edilememiştir. Sonuç olarak Real-Time PCR yönteminin patojenin tanısında daha hassas ve güvenilir olduğu belirlenmiştir.

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'i tohumdan tespit etmek amacıyla TaqMan prob ve DNA'ya bağlanan EMA (ethidium monoazide) kullanılmıştır. Canlı ve ölü bakterilerin ayrılabilirdiği bu yöntem Real-Time PCR ile kullanılmış ve başarılı olmuştur (Luo vd 2008).

Basım ve Basım (2009), Asma'da ciddi kayıplara neden olan Pierce's Hastalık etmeni *Xylella fastidiosa* için geliştirdikleri EBXY1-EBXY2 primer çifti ve TaqMan probu kullanarak Real-Time PCR yöntemi ile oldukça kısa sürede direkt bakteriyel hücreden ve hastalıklı asma dokusundan patojenin tanısını ve tespitini yapmışlardır.

Basım ve Çaplık (2009), domates bitkisinde önemli kayıpların sebep olan bakteriyel etmenler *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın tanı ve tespitini yapmak amacıyla Real-Time PCR yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntem dahilinde *Cmm*'ye ait *pat-1* gen dizisi ve *Xav*'ye ait *hrp* gen dizisini kullanarak dizayn ettikleri primer setlerini kullanarak patojenlere spesifik ve hassas sonuçlar elde etmişlerdir. Dizayn ettikleri primer setlerini farklı bitki patojeni bakterilere karşı test ederek, primer setlerinin sadece hedef patojenlere özgün olduğunu belirlemişlerdir.

Basım ve Öztürk (2011), yapılan çalışmada, fasulye yetiştiriciliğinde sorun yaratan Bakteriyel Hale Yanıklık Hastalık etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, Bakteriyel Yaprak Yanıklık Hastalık etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* patojenlerinin patojenisiteden sorumlu özel gen bölgelerinden dizayn edilen primeler ve LNA prob kullanarak Real-Time PCR ile tespitleri ve tanıları yapmışlardır. Farklı bitki patojeni bakteriler kullanarak geliştirilen primer ve probların spesifikliğini test etmişlerdir. Geliştirilen Real-Time PCR yöntemi ile patojenlerin bakteriyel hücreden, tohumdan ve hastalıklı bitki materyallerinden hızlı ve hassas bir şekilde tespitinin ve tanısının yapılabildiği ortaya çıkarılmıştır.

Basım ve Bozan (2011), Ateş Yanıklığı hastalık etmeni *Erwinia amylovora*'nın tanı ve tespitini yapmak amacıyla Real-Time PCR yöntemini kullanmışlardır. Primer seti

dizaynı için bakteriyel patojenin polisakkarit üretiminden sorumlu ve kromozom üzerinde bulunan *ams* gen'inin 1,6 kb'lik internal diziliminden yararlanmışlardır. Dizayn edilen primer seti ve LNA prob kullanarak 63 bp'lik PCR ürünü çoğaltmışlardır. Primer seti ve probun *Erwinia amylovora* patojenine spesifik olduğunu belirlemek amacıyla *E. amylovora* strainlerini ve farklı türlere ait bakteriyel patojenleri kullanmışlardır. Ayrıca çalışma kapsamında Kantitatif Real-Time PCR yöntemi kullanılarak *Erwinia amylovora*'nın hastalıklı ve sağlıklı bitki aksamlarından tespitini yapmışlar, epifitik popülasyonun çiçeklenme döneminden üretim sezonuna kadar değişimini tespit etmişlerdir. Bu sonuçlarla patojenin dönemsel olarak popülasyon değişimlerini belirleyerek, bilinen bir dayanıklı çeşit olmayan bu patojene karşı etkin ve doğru bir mücadelenin önünü açmışlardır.

Basım ve Baki (2014), domates üretiminde önemli kayıplara sebep olan Öz Nekrozu patojenleri üzerine çalışmışlardır. Öz nekrozu etmenleri *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mediterranea* ve *Pseudomonas viridiflava*'nın Real-Time PCR yöntemi ile tanı ve tespitini yapmak amacıyla patojenlerin patojenisitesinden sorumlu gen bölgelerinden primer setleri ve proplar dizayn etmişlerdir. Dizayn ettikleri primer setleri ve propları kullanarak Öz Nekrozu etmenlerinin hepsini ayrı ayrı tespit edebilmişlerdir. Dizayn ettikleri bu primer seti ve propların spesifikliğini test etmişlerdir. Geliştirdikleri Real-Time PCR yöntemi ile etmenlerin hastalıklı bitki dokularından ve bakteriyel hücreden hızlı ve hassas bir şekilde tespit edilebileceğini ortaya koymuşlardır.

Turunçgillerde önemli derecede kayıplara sebep olan Stubborn hastalık etmeni *Spiroplasma citri*'nin Real-Time PCR yöntemi ile kısa sürede ve hassas bir şekilde tespiti yapılmıştır. Yöntemde kullanılmak üzere için *Spiroplasma citri*'nin prophage gen bölgesinden Php-orf1 ve Php-orf3 primer seti geliştirilmiştir. Geliştirilen Php-orf1 ve Php-orf3 primer seti ve SYBR-green kullanılarak etmenin teşhisi yapılmıştır. (Wang vd 2014).

Gallelli vd (2014), kivi (*Actinidia deliciosa* ve *A. chinensis*) üretim alanlarında pandemik salgınlara sebep olan *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*'nin kısa sürede, hassas bir şekilde tanı ve tespitini yapmak amacıyla Real-Time PCR yöntemini kullanmışlardır. Real-Time PCR yönteminde kullanılmak üzere patojenin *hrpW* gen bölgesinden 593 bp'lik internal dizilimden primer setleri dizayn etmişlerdir. P3F/P5R1 primer seti ile 147 bp, P3F/P6R primer seti ile 158 bp'lik amplikasyonlar elde etmişlerdir. Primer setleri ve probun patojene spesifikliğini belirlemek için *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strainleri ve farklı türlere ait bakteriyel strainler ile test etmişlerdir. Aynı çalışma içerisinde Kantitatif Real-Time PCR ile bakteriyel patojenin kivi bitkilerindeki popülasyon değişimlerini sayısal olarak belirlemişlerdir.

### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriyel Strainler

Bu çalışma kapsamında Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Fitopatoloji Anabilim Dalı, Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda Prof. Dr. Hüseyin BASIM tarafından oluşturulmuş kültür stoklarında yer alan yerli ve yabancı *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strainleri ve farklı cins ve türlere ait bitki patojeni bakteriler kullanılmıştır (Çizelge 3.1, Çizelge 3.2, Çizelge 3.3).

Çizelge 3.1. Real-Time PCR'da test edilen yerli *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strainleri

İzolat	Bakteri Türü	Orijin	Referans
I-2	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Türkiye	Basım 2008
I-7	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Türkiye	Basım 2008
I-15	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Türkiye	Basım 2004
I-20	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Türkiye	Basım 2004
I-21	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Türkiye	Basım 2004
Pss Kampüs	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Türkiye	Basım 2006
Pss Varsak	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Türkiye	Basım 2006
M1	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Türkiye	Basım 2004
N1	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Türkiye	Basım 2006
MM-Burhaniye	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Türkiye	Mirik 2016
MM-Güre	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Türkiye	Mirik 2016
MM-Akçay	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Türkiye	Mirik 2016
MM-Orhangazi	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Türkiye	Mirik 2016

Çizelge 3.2. Real-Time PCR'da test edilen yabancı *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strainleri

İzolat	Bakteri Türü	Orijin	Referans
O-I	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Italy	G. M. Balestra
O-II	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Italy	G. M. Balestra
N-I	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Italy	G. M. Balestra
N-II	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	Italy	G. M. Balestra

Çizelge 3.3. Real-Time PCR’da kullanılan farklı türe ait bitki patojeni bakteriler

Bakteri Türü	Orijin	Konukçu	Referans
<i>Acidovorax citrulli</i>	Türkiye	Karpuz	Basım 2008
<i>Bacillus subtilis</i>	Türkiye	Toprak	Basım 2008
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Türkiye	Domates	Basım 2008
<i>Erwinia amylovora</i>	Türkiye	Armut	Basım 2011
<i>Dickeya chrysanthemi</i>	Türkiye	Domates	Basım 2006
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Türkiye	Domates	Basım 2004
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Türkiye	Biber	Basım 2009
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Türkiye	Domates	Basım 2008
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Türkiye	Domates	Basım 2008
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	Türkiye	Domates	Basım 2004
<i>Xylella fastidiosa</i>	Türkiye	Asma	Basım 2009
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Türkiye	Lahana	Basım 2009
<i>Rhizobium vitis</i>	Türkiye	Asma	Argun 2001
<i>Rhizobium tumefaciens</i>	Türkiye	Toprak	Basım 2006

### 3.2. Primerler ve Probun Tasarlanması

Zeytin Dal Kanseri etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin Real-Time PCR yöntemiyle tanısı için *iaaL* gen bölgesine ait dizilerden prob ve primerler tasarlanmıştır. IAA üretimiyle ilgili *iaaL* geninin amplifikasyonu referans EW 2009 straininin DNA dizilişinden (Francisco vd 1990) faydalanılmıştır. Yerli ve yabancı *Pss* strainleri, *iaaL* gen dizisi kullanılarak elde edilen primer seti PSS3 5'- CAG GAC TTC AGA ACC CAC GT -3' ve PSS4 5'- CGG TCG ATG ATG TAG AGC AT -3' (Basım ve Ersoy 2002), ile klasik PCR'da test edilmiştir (Çizelge 3.10). Tüm yerli ve yabancı *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strainlerinin *iaaL* gen dizisi üzerindeki 1064 bp'lik kısmı klasik PCR ile amplifiye edilmiştir (Çizelge 3.10, Şekil 4.1).

Öncelikle Klasik PCR yöntemi ile ilgili bölgeler amplifiye edilmiş, daha sonra amplifiye edilen bölgeler dizi analizi yapılarak, dizi analizi sonuçlarının gen bankasında yer alan ilgili diziler ile bire bir örtüştüğü görülmüştür. Klasik PCR yöntemi ile amplifiye edilen dizilerden patojenlerinin Real-Time PCR ile tanısı ve tespiti için özel primerler ve prob tasarlanmıştır (Çizelge 3.10, Çizelge 3.11).

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strainlerinin klasik PCR ile tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi amacıyla kullanılan PCR programı Çizelge 3.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strainlerinin klasik PCR ile tanı ve tespitinin gerçekleştirilmesi amacıyla hazırlanan PCR programı

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (Saniye)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	300	1
Denatürasyon	95	30	
Bağlanma	62	30	35
Uzama	72	45	
Son Uzama	72	300	1

Klasik PCR işleminde kullanılan PCR karışımı; toplam hacim 50 µl olacak şekilde 4 µl bakteriyel süspansiyon, primerlerin her birinden 1 µl, 8 µl dNTP karışımı, 5 µl 10× tampon çözelti, 3 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,25 µl *Taq* polimeraz ve 27,8 µl steril deiyonize saf su şeklindedir. Amplifikasyon için Techne TC-512 Gradient Thermal Cycler (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, İngiltere) kullanılmıştır.

Elde edilen PCR ürünleri (15 µl), %2'lik agaroz jelde 80 voltta 120 dakika yürütülmüştür. Yürütme işleminde ve agaroz jelin hazırlanmasında TAE (Tris-Baz 4,84 g, Asetik Asit [Glasiyel] 1,02 ml, 0,5 M EDTA [pH: 8,0] 2 ml, ddH<sub>2</sub>O 1000 ml) kullanılmıştır.

Yürütme işlemi sonunda PCR ürünleri, etidyum bromür (0,5 µg/ml) ile 20 dakika boyanmış ve ultraviyole ışıkta görüntülenmiştir. Görüntüleme için Vilber Lourmat SR 12575 transillüminatör ve BioCapt Version 11.02 programı kullanılmıştır.

Klasik PCR işleminde kullanılan bakteriyel süspansiyonların hazırlanması için -86 °C de stoklanan *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strainleri PVF1 besi ortamı içeren petrilere inoküle edilmiş ve 27 °C'de 72 saat boyunca geliştirilmiştir. Bu ortamda geliştirilen bakteriler steril deiyonize su ile süspense edilmiş ve bakteriyel konsantrasyonun 1×10<sup>8</sup> cfu/ml olması sağlanmıştır. İnokulum konsantrasyonunun spektrofotometrik olarak saptanmasında Eppendorf Biophotometer 6131 kullanılmıştır. İnokulumun optik yoğunluğu 1×10<sup>8</sup> cfu/ml'ye karşılık gelen OD<sub>600</sub>=0,1 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Çizelge 3.5. Klasik PCR yöntemi ile *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* etmenlerinin tanısı için kullanılan primerler

Bakteri	Primerler	Dizi	Referans
<i>Pseudomonas savastanoi</i>	PSS3	CAGGACTTCAGAACCCACGT	(Basım ve Ersoy 2002)
pv. <i>savastanoi</i>	PSS4	CGG TCG ATG ATG TAG AGC AT	(Basım ve Ersoy 2002)

Çizelge 3.6. Real-Time PCR yöntemi ile *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* tanısı için geliştirilmiş olan primerler

Etmen	Primer	Dizi	PCR Ürünü
<i>Pseudomonas savastanoi</i>	HBPSSR	ACTTCATGGGCAACCTCATC	69
pv. <i>savastanoi</i>	HBPSSL	GGCGACAAGCTCTACCT	

Primerler ve propların belirlenmesinde insan gen transkriptlerinin Real-Time PCR ile belirlenmesi için oluşturulan LNA (Locked Nucleic Acid) sistemi kullanılmıştır (Petersen ve Wengel 2003). Çalışmada kullanılan LNA prob, bugün Real-Time PCR sistemleri için sıklıkla kullanılan 25-30 nükleotitlik uzun proplardan farklılık göstermektedir. LNA proplar 8-9 nükleotid uzunluğuna sahip olup, son teknolojik özellikleri sayesinde, uzun dizilere sahip proplar kadar, güvenilir ve hassas sonuçlar elde edilmektedir. Bu çalışmada kullanılan proplar için raportör boya fluorescein amidit (FAM), baskılayıcı boya ise karboksitetrametilrodamid (TAMRA).



Çizelge 3.7. Real-Time PCR yöntemi ile *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin tanısı için geliştirilmiş olan prob

ETMEN	PROB DİZİSİ
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	CATCCAGC

TGGACAAAGACGGCTTCGCGGCACAGACTGAACGCTGTCTAGAGCGCAATGAGCGAAACTGCCTGATCGGCTTTTACCAGTGGCACCAGCGGCAACATCAAACGCTGTTATTACTACTACGACTGCGAAGTCGATGAAGACAGCTCCCTCTCCAACGTCTTCCGCAGCAACGGCTTTATTCTGCCCGGTGATCGCTGCGCCAACCTGTTTCGATCAACCTGTTTTCTGCTCTGAACAACACGATTACCATGATGGCCGGTAACTGCGGTGCTCACGTGCTGTCCGTAGGTGACATCACCTGGTGACCAAGAGCCATTTGGAAGCGCTTAACTCGATCAAGCTCAACGTA CTGCTCGGCGTGCCATCCACTATCTTGCAGTTCATCAATGCCATGCAACATAACGGTGTGCACATCAATA TCGAGAAGGTTGTCTTACCAGGCGAGAGCCTGAAAACCTTCCAGAAGAAAATCATCAGGCAAGCCTTTGG CGAACAAAGTCTCCATCGTTCGGTGTGTATGGCAGTTCGAGGGCGGCATTCTCGGTTTACCAACAGCCCT TGCCACACTGAATACGAGTTTCTGTCCGACAAGTATTTTCATCGAAAAAGAAGCGACAGCATCCTCATCA CCTCGCTGACCCGAGAAAACCTTACGCCGCTGCTGAGGTATCGCCTAGGAGACACCGCAACCTTTTCGAT GAAA **GGCGACAAGCTCTACCT** GACAGA **CATCCAGC** GGGAGGACATGAGCTTCA **ACTTCATGGGCAACCTC ATC** GGGCTGGGCATCATTAGCAAAACGATTA AACAGACACTGGGCCGATCGCTGGAAAATCCAGGTTCACTGTCAGTGACCGAAGAGCGCAAGGAAGTGGTGACCGTTTTTCGTTTCAGGCCTCTGAAGTCGATGAAGACGA ACGCGTCAGAATCGAAACAGCCATCGCCGATATCCCCGACATCAAAGAGGGCTATCAGAAAAACCAAGGC ACCGTGTGGTCTCGCGCAAGGATGCCAGAGACTACGCGGTCTCGGAGCGAGGCAAAAATGCTCTACATCA TCGACCGCCGAAACTGAATGGCTGATGTGA

Şekil 3.1. Real-Time PCR'da *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin tanısı için kullanılan HBPSR ve HBSSL primerlerinin ve probun gen üzerindeki bağlanma yerleri (Yeşil renk: Real-Time PCR primerlerini, Kırmızı renk: Probu temsil etmektedir)

### 3.3. Real-Time PCR Optimizasyonu

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin Real-Time PCR ile kısa sürede tanılarının gerçekleştirilmesi amacıyla Real-Time PCR programı Çizelge 3.8'de verilmiştir. Her bir Real-Time PCR işleminde, toplam hacim 27,6 µl olacak şekilde 2 µl bakteriyel süspansiyon ya da kalıp DNA, primerlerin her birinden 1,2 µl, TaqMan prob 0,3 µl, dNTP karışımı 4,8 µl, 10X tampon çözelti 3 µl, MgCl<sub>2</sub> 7,2 µl, Taq polimeraz 0,36 µl ve 9,54 µl steril deiyonize su kullanılmıştır. Çalışmada Cepheid Smart Cycler II Real-Time PCR cihazı ve Cepheid Smart Cycler Software V.2.0c programı kullanılmıştır.

Çizelge 3.8. Real-Time PCR optimizasyonu sonucunda *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* için oluşturulan Real-Time PCR programı

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (Saniye)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	120	1
Denatürasyon	95	20	
Bağlanma	62	20	30
Uzama	72	20	
Son Uzama	72	60	1

### 3.4. Primerler ve Probların *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Strainlerine Spesifikliğinin Belirlenmesi

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* patojenine özel tasarlanan primer seti ve prob kullanılarak kültür koleksiyonunda bulunan *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strainlerinin tanısı ve tespiti gerçekleştirilmiştir. Çalışmada Real-Time PCR işleminde kullanılan bakteriyel süspansiyonun hazırlanması için -86°C de stoklanan *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strainleri, PVF1 besi ortamı içeren petrilere inoküle edilmiş ve 27°C'de 72 saat boyunca geliştirilmiştir. PVF1 besi ortamında geliştirilen bakteriler steril deiyonize su ile süspansiyon edilmiş ve bakteriyel konsantrasyonun  $1 \times 10^8$  cfu/ml olması sağlanmıştır. Süspansiyon konsantrasyonunun spektrofotometrik olarak saptanmasında Eppendorf Biophotometer 6131 (Eppendorf AG, Hamburg, Almanya) kullanılmıştır. Süspansiyonun optik yoğunluğu  $1 \times 10^8$  cfu/ml'ye karşılık gelen  $OD_{600}=0,1$  olacak şekilde ayarlanmıştır. Her strainden elde edilen süspansiyondan 2 µl alınarak Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

### 3.5. Primer Seti ve Probu Saf DNA'dan Hassasiyetinin Belirlenmesi

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* etmeninin Real-Time PCR ile tespit edilecek en düşük DNA miktarının tespiti için saf DNA'dan hassasiyet çalışması yapılmıştır. Çalışma için kültür koleksiyonunda yer alan *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* O-II straininden faydalanılmıştır. DNA izolasyonunda Thermo FastPrep FP120A-230 multi tüp homojenizatör (Thermo Scientific, Massachusetts, ABD) ve Qbiogene/BIO101 FastDNA moleküler izolasyon kitini (MP Biomedicals, Kaliforniya, ABD) ihtiva eden kombine sistem kullanılmıştır. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strainlerinden izole edilen DNA'nın saflığı ve nanogram düzeyinde konsantrasyonun belirlenmesinde Thermo NanoDrop ND-1000 spektrofotometre (Thermo Scientific, Massachusetts, ABD), pikogram düzeyinde konsantrasyonun belirlenmesinde Invitrogen Qubit florometre (Invitrogen, Kaliforniya, ABD) kullanılmıştır. Real-Time PCR yönteminin hassasiyetinin belirlenmesinde *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* için 51 pg, 40 pg, 30,4 pg, 20,4 pg ve 11,8 pg DNA seviyeleri test edilmiştir. Pikogram düzeyine kadar seyreltmeler için steril deiyonize su kullanılmıştır. Elde edilen her bir seviyedeki DNA'lardan 2 µl alınarak Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

### 3.6. Direkt Bakteriyel Hücreden Primer Seti ve Probu Hassasiyetinin Belirlenmesi

Bakteriyel patojen *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin Real-Time PCR ile tespit edilebilecek en düşük bakteri sayısının tespiti için, patojen kültür koleksiyonundan alınıp PVF-1 besi ortamında geliştirilmiş, kolonilerden yoğun bir stok çözelti hazırlanmıştır. Oluşturulan stok çözeltiden  $10^{-1}$ 'den  $10^{-10}$ 'a kadar  $10^7$ 'un katları şeklinde seyreltmeler 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve bunlar ayrı ayrı tüplere konulmuştur. Elde edilen her bir solüsyondan 2 µl alınıp Real-Time PCR işlemi için kullanılmıştır. Bu aşamada Real-Time PCR ile tespit edilecek en düşük bakteri sayısının tespiti hedeflendiğinden  $10^{-1}$ 'den  $10^{-10}$ 'a kadar seyreltilen ve ayrı tüplere alınan süspansiyonlardan 2 µl alınıp 50 µl steril deiyonize su içerisinde karıştırılmış ve NA besi ortamlarına steril yayma çubuk ile inoküle edilmiştir. İnokulasyondan sonra besi ortamlarında gelişen bakteri sayılarını tespit etmek için petrilere 4 gün boyunca 27 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

### 3.7. Primerler ve Probun Seçiciliğinin Belirlenmesi

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* için geliştirilen primer ve probun özgüllüğünü belirlemek için primer prob seti *Pseudomonas* grubu bitki patojenlerine sonra farklı diğer bitki patojeni bakteri türlerine karşı test edilmiştir (Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3). Ayrıca geliştirilen primer prob seti *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* gibi urlar oluşturan *Rhizobium tumefaciens* ve *Rhizobium vitis*'e karşı test edilmiştir. Real-Time PCR işleminde kullanılan bakteriyel süspansiyonların hazırlanması için -86 °C de stoklanan; *Acidovorax citrulli*, *Bacillus subtilis*, *C. michiganensis subsp. michiganensis*, *Erwinia amylovora*, *Dickeya chrysanthemi*, *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, *P. syringae* pv. *tomato*, *P. syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas viridiflava*, *Xylella fastidiosa*, *X. campestris* pv. *campestris* uygun besi ortamlarını içeren petrilere inoküle edilmiş ve 27 °C'de 72 saat boyunca geliştirilmiştir. Bu ortamlarda geliştirilen kolonilerden biri seçilerek steril deiyonize su ile süspansiyon edilmiştir. Bakteriyel konsantrasyonun  $1 \times 10^8$  cfu/ml olması sağlanmıştır. Süspansiyonun konsantrasyonunun spektrofotometrik olarak saptanmasında Eppendorf Biophotometer 6131 kullanılmıştır. Süspansiyonun optik yoğunluğu  $1 \times 10^8$  cfu/ml'ye karşılık gelen  $OD_{600}=0,1$  olacak şekilde ayarlanmıştır. Her strainden elde edilen süspansiyondan 2 µl alınarak Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

### 3.8. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin Hastalıklı Bitki Dokularından Tespiti

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin hastalıklı bitki dokularından tespiti için grimsi yeşil tondaki taze urlar alınarak %70' lık alkole batırılıp, kısa süre ateşten geçirilmiş ve birkaç damla steril fosfat buffer (0,05 M) ( $Na_2HPO_4$ , 4,26 g,  $K_2HPO_4$ , 2,72 g, 1000 ml saf steril su) ile steril porselen bir havan içinde ezilerek, stok solüsyon elde edilmiştir (Şekil 3.2). PCR işlemlerinin başarısını etkileyebileceğinden stok solüsyon on kat seyreltilerek bir solüsyon daha hazırlanmıştır. Her solüsyondan 2 µl alınarak Real-Time PCR işlemleri yapılmıştır.



Şekil 3.2. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin hastalıklı bitki dokularından tespiti için stok solüsyon hazırlanması (Bu çalışmadan)

Bitki total DNA'sı ile tasarlanan primer ve probun herhangi bir amplifikasyon oluşturup oluşturmadığını kontrol etmek için sağlıklı bitkiden örnek alınarak bitki total genomik DNA izolasyonu yapılmış ve çalışmada bitki total genomik DNA'sı da kontrol edilmiştir. Bitkilerden DNA izolasyonunda Thermo FastPrep FP120A-230 multi tüp

homojenizatör ve Qbiogene/BIO101 FastDNA moleküler izolasyon kitini ihtiva eden kombine sistem kullanılmıştır. Zeytin bitkilerinden izole edilen DNA'nın saflığı ve nanogram düzeyinde konsantrasyonun belirlenmesinde Thermo NanoDrop ND-1000 spektrofotometre kullanılmış ve bitki DNA konsantrasyonu yaklaşık 100-150 ng/µl olacak şekilde seyreltilmiştir.

### 3.9. Real-Time Membran Bio-PCR

Hastalıklı zeytin bitkilerinden alınan örnekler üzerinde hem canlı hem de ölü bakteriler bulunmaktadır. Real-Time PCR yönteminde ölü bakterilerin tespiti de yapıldığı için, sadece canlı bakterileri tespit etmek amacıyla Membran Bio-PCR tekniği uygulanmıştır. Bu işlem için hastalık semptomu olan ve olmayan zeytin dallarından 10 g. alınarak, 250 ml. 0,05M steril fosfat tampon çözeltisi ile yıkanmış ve 15 dakika çalkalayıcıda bekletilmiştir. Yıkamanın ardından soğuk sterilizasyon aleti yardımıyla 47 mm çapında ve 0.2 µm' lik deliklere sahip membran filtrelerden geçirilmiştir. Bu filtreler bakterili kısım üste gelecek şekilde yarı seçici PVF1, King's B, NSA (Nutrient Saccarose Agar) ve NA ortamlarının üzerine yerleştirilmiştir. Filtrelere yerleşmiş olan bakteriler gelişmeleri için, bu ortamlar içerisinde 28° C' de 15 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından bu filtreler 50 ml' lik steril test tüplerine aktarılmış ve üzerine 10 ml steril saf su eklenerek, vorteks edilmiştir. Vorteks işleminden sonra oluşan solüsyondan 1 ml alınarak başka bir tüpe konulmuştur. Bu solüsyon 10<sup>-1</sup>' den 10<sup>-3</sup>' a kadar 10' un katları şeklinde seyreltilmiştir. Seyreltilen solüsyonlardan 2 µl alınarak patojen bakteriye özel geliştirilen primer seti ve prob ile Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

### 3.10. Kantitatif Real-Time Membran Bio-PCR ile Bitki Materyallerindeki Bakteri Populasyon Değişimlerinin Belirlenmesi

Hastalıklı bitki materyallerindeki bakteri sayısının belirlenmesi için Kantitatif Real-Time PCR yöntemi uygulanmıştır. İlk aşamada kültür koleksiyonundan alınan *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin I2 straini PFV-1 besi ortamında geliştirilmiş, gelişen kolonilerden yoğun bir stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti 10<sup>-1</sup>' den 10<sup>-10</sup>'a kadar 10'un katları şeklinde seyreltme uygulanarak solüsyonlar hazırlanmıştır. Stok ve her bir seyreltilmiş solüsyondan 2 µl alınıp Kantitatif Real-Time PCR işlemi uygulanmıştır. Bu işleme eş zamanlı olarak da hazırlanan solüsyonlardan 2 µl alınıp, 50 µl saf su ile karıştırılarak, besi ortamlarına yayma yapılmıştır. Yayma sonucu oluşan koloni sayılarını görmek için petriyeler 27 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Real-Time PCR' da en düşük yoğunlukta amplifikasyonun gerçekleştiği süspansiyondan yayma yapılan petride 2 gün sonra meydana gelen bakteri gelişimine bakılarak, bakteriyel koloniler sayılmıştır. Sayım sonrası elde edilen veriler Kantitatif Real-Time PCR işlemi için programa kaydedilmiştir. Kantitatif Real-Time PCR işlemi sonrası oluşan amplifikasyon değerine bağlı olarak bir standart eğri oluşturulmuştur. Bu eğride verilerin güvenilir değerlerde olabilmesi için regresyon değerinin 1'e yakın olması gerekmektedir. Oluşturulan bu referans bilgi, sağlıklı veya hastalıklı bitki materyallerinden hazırlanmış bir bakteriyel solüsyonun 2 µl' sindeki bakteri sayısının belirlenmesinde kullanılabilecek düzeye getirilmiştir. İşlem sonrası oluşan standart eğri üzerinde de bakteri sayısına bağlı olarak örneğin yeri otomatik olarak belirlenebilmektedir. Sonuçta, sağlıklı ve hastalıklı bir bitki materyalinden alınan örnekte Zeytin Dal Kanseri Hastalığına neden olan patojenin yoğunluğunu tespit edebilecek referans bilgi elde edilmiştir.

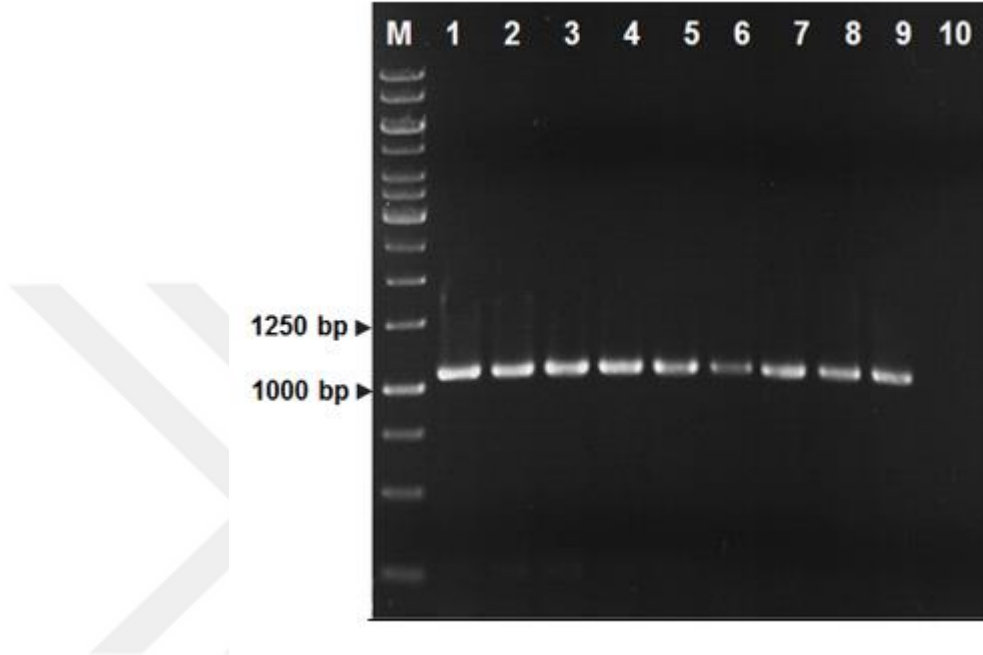
*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin epifitik popülasyon değişimini örnelemek adına Antalya'nın 2 farklı bölgesindeki zeytin ağaçlarından, hastalık simptonu gösteren ve göstermeyen dallardan alınan örnekler Kantitatif Real-Time Membran Bio-PCR yöntemiyle test edilmiştir.



#### 4. BULGULAR

##### 4.1. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin Klasik PCR ile Tanısı

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin Klasik PCR ile tanısını gerçekleştirmek için; PSS3-PSS4 (Basım ve Ersoy 2002) primer seti ile test edilmiştir (Çizelge 3.5, Şekil 4.1).

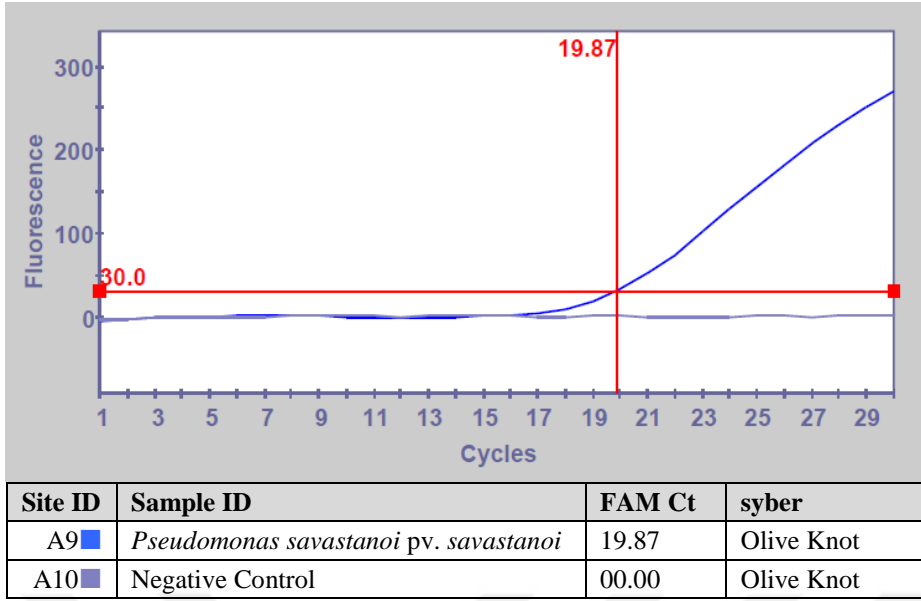
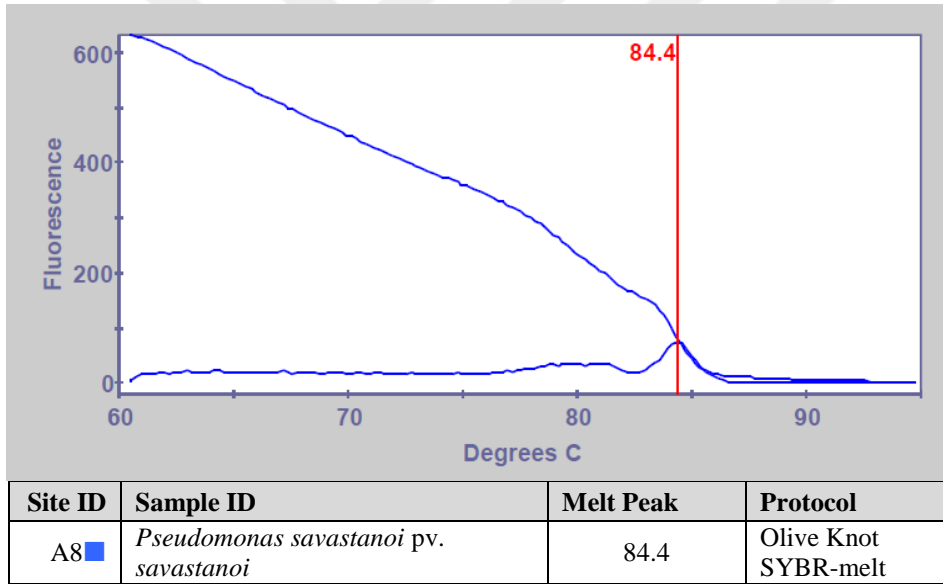


Şekil 4.1. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin Klasik PCR ile Tanısı. M, marker; 1- I2; 2- I7; 3- I21; 4- I9; 5- M2; 6- O-I; 7- O-II; 8- N-I; 9- N-II; 10- NK (Negatif kontrol)

##### 4.2. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin Real-Time PCR ile Tanısı

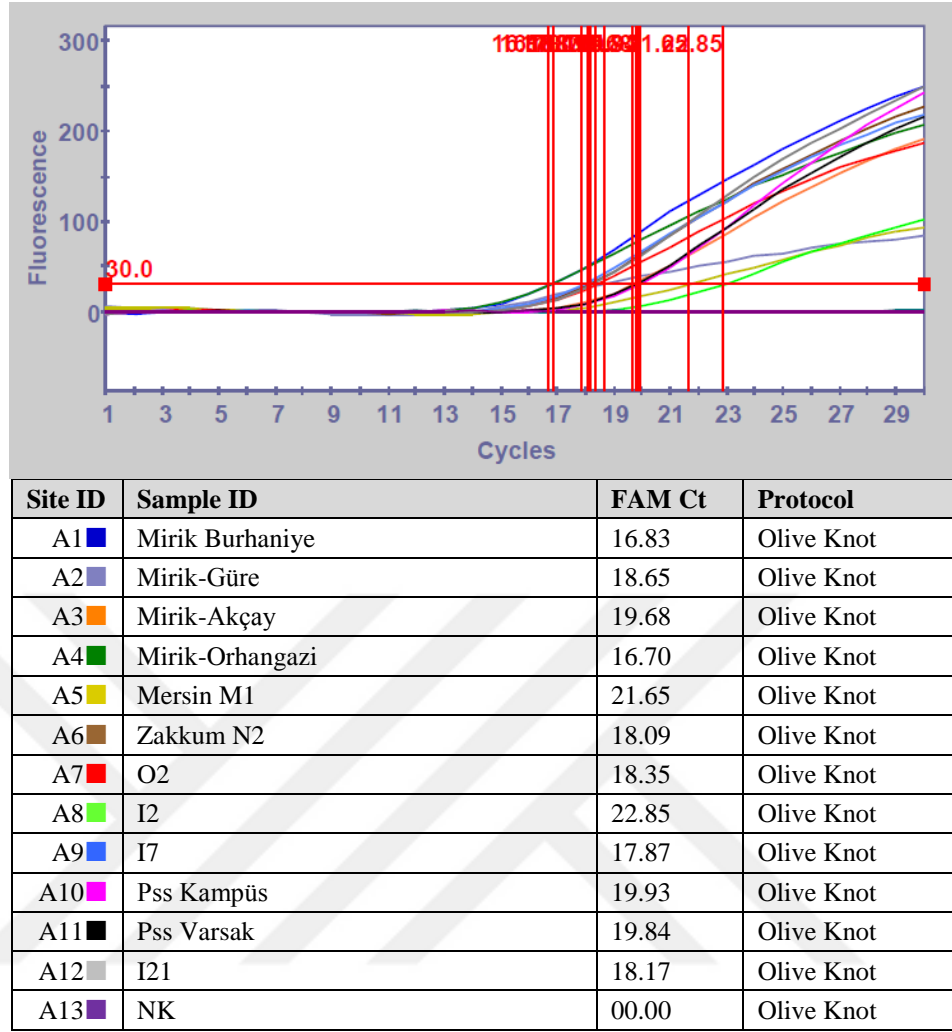
*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin Real-Time PCR ile tanısını gerçekleştirmek için Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Fitopatoloji Anabilim Dalı'na ait kültür koleksiyonunda yer alan *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strainleri kullanılarak primer seti-probun ve Real-Time PCR programlarının kontrolü yapılmıştır (Şekil 4.2).

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin tanısında kullanılan primer seti ve SYBR Green kullanılarak Real-Time PCR ile tek bir pik eğrisinin elde edildiğini göstermek amacıyla Thermal Melting (Erime Eğrisi) eğrisi elde edilmiştir. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* için kullanılan primerlerin maksimum erime sıcaklığı 84.4 °C olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.3).

Şekil 4.2. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin Real-Time PCR ile tanısıŞekil 4.3. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin SYBR Green-melt grafiği

#### 4.3. Real-Time PCR ile *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Strainlerinin Tanısı

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin Real-Time PCR ile tanısını gerçekleştirmek için kültür koleksiyonunda yer alan yerli ve yabancı *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strainleri kullanılarak primerler ve probun strainlere spesifikliğı test edilmiştir. Tasarlanan primerler ve probun *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin farklı strainlerine de spesifik olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4).

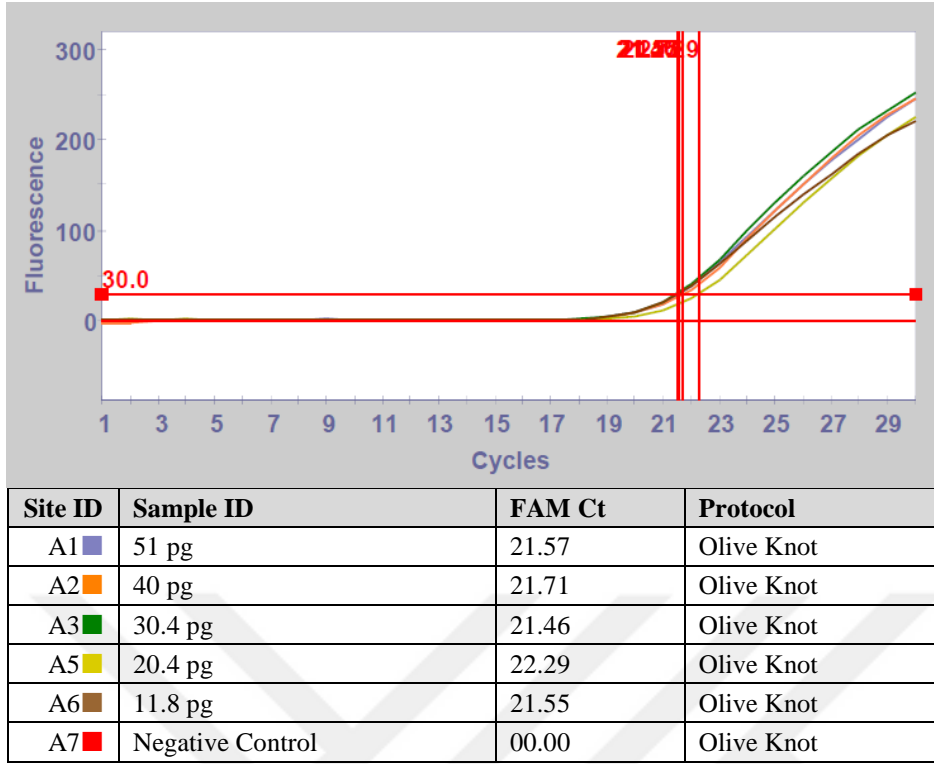


Şekil 4.4. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* Strainlerinin Real-Time PCR ile tanısı

#### 4.4. Primer Seti ve Probuun Saf DNA'dan Hassasiyeti

Real-Time PCR ile primer seti ve probun genomik DNA'dan hassasiyetini belirlemek için *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'den izole edilen genomik DNA'nın önce nanogram düzeyinde devamında pikogram düzeyinde ölçümleri yapılmıştır. Pikogram düzeyindeki ölçümlerde yaklaşık 51 pg, 40 pg, 30,4 pg, 20,4 pg ve 11,8 pg olacak şekilde seyreltmeler yapılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda patojenin tespitinde kullanılan primer seti ve probun genomik DNA'dan tespit limiti 11,8 pg olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.5).





Şekil 4.5. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin tespitinde kullanılan primer seti ve probun saf DNA'dan hassasiyeti

#### 4.5. Direkt Bakteriden Primer Seti ve Probun Hassasiyeti

Direkt bakteriden yapılan hassasiyet çalışması sonucunda, Real-Time PCR ile *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin direkt bakteriyel hücreden tespit limiti 2 hücre (Çizelge 4.1) olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.7).

Bu işleme eş zamanlı olarak NA besi ortamına yapılan inokülasyon sonrası *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin tespit limiti mililitrede 2 canlı bakteri hücresi olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.6).

Çizelge 4.1. Real-Time PCR ile ve *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin direkt bakteriyel hücreden tespiti ve hassasiyet limitlerinin belirlenmesi

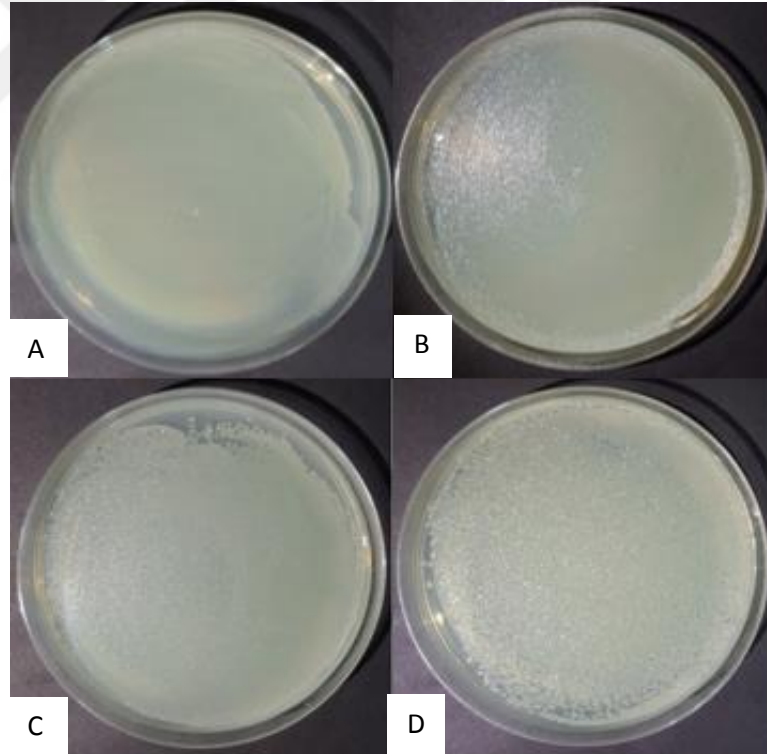
Konsantrasyon	RT-PCR Sonucu	Bakteri sayıları (cfu/ml)					P/N
	FAM (Ct)	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>			std	
<b>Stok</b>	15.51	*	*	*	-	-	+
<b>10<sup>-1</sup></b>	17.40	*	*	*	-	-	+
<b>10<sup>-2</sup></b>	19.58	*	*	*	-	-	+
<b>10<sup>-3</sup></b>	21.92	*	*	*	-	-	+
<b>10<sup>-4</sup></b>	24.44	<b>5284</b>	<b>5277</b>	<b>5296</b>	<b>5285</b>	<b>4.26</b>	+
<b>10<sup>-5</sup></b>	20.46	<b>780</b>	<b>773</b>	<b>788</b>	<b>780</b>	<b>2.49</b>	+
<b>10<sup>-6</sup></b>	20.23	<b>74</b>	<b>76</b>	<b>78</b>	<b>76</b>	<b>1.63</b>	+
<b>10<sup>-7</sup></b>	21.14	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>12.6</b>	<b>0.57</b>	+
<b>10<sup>-8</sup></b>	21.24	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>2.3</b>	<b>0.33</b>	+
<b>10<sup>-9</sup></b>	00.00	0	0	0	0	0	-
<b>10<sup>-10</sup></b>	00.00	0	0	0	0	0	-
<b>Negatif Kontrol</b>	00.00	0	0	0	0	0	-

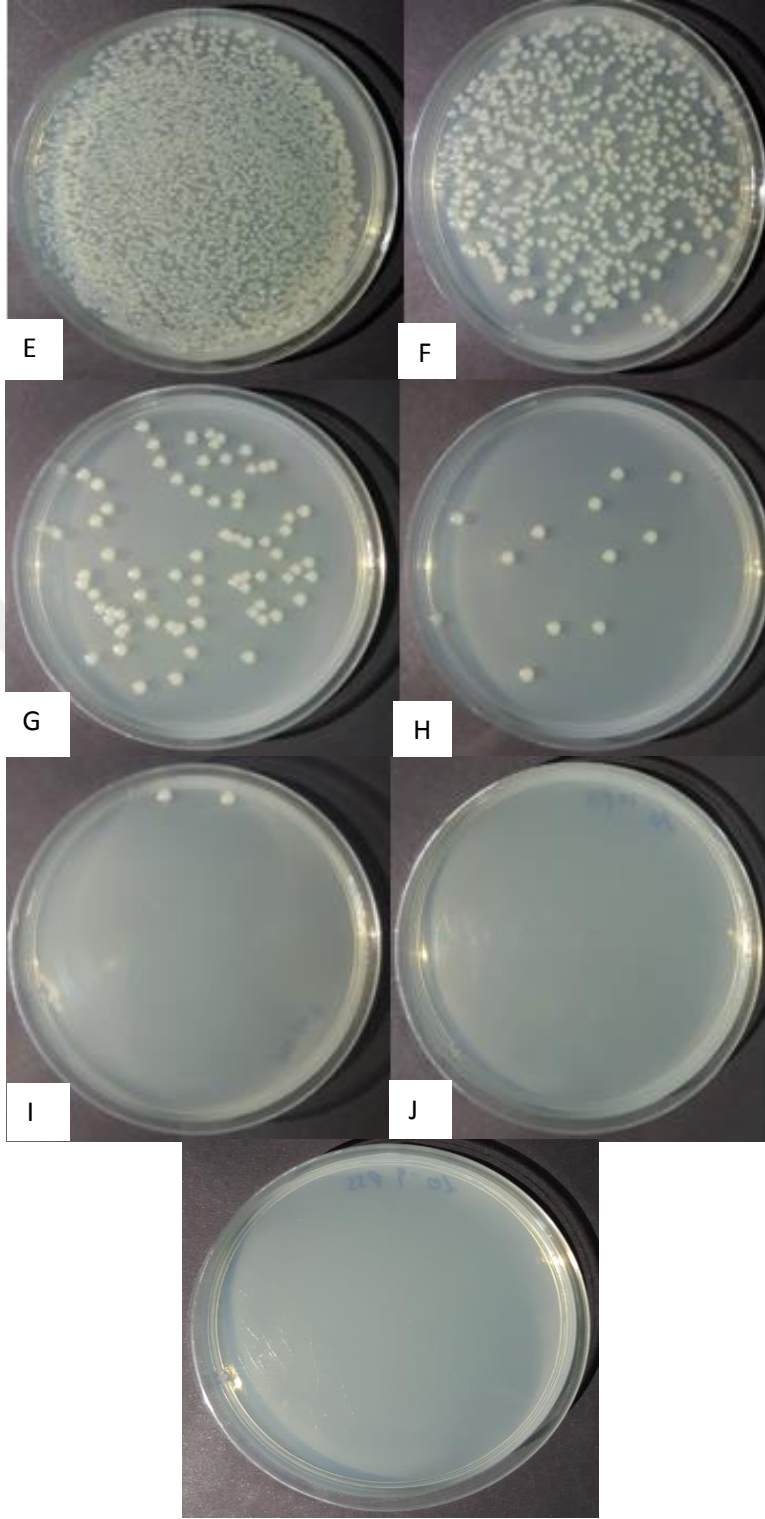
\*: Petride yoğun bakteri gelişimi nedeniyle sayılamadı

std: Standart sapma

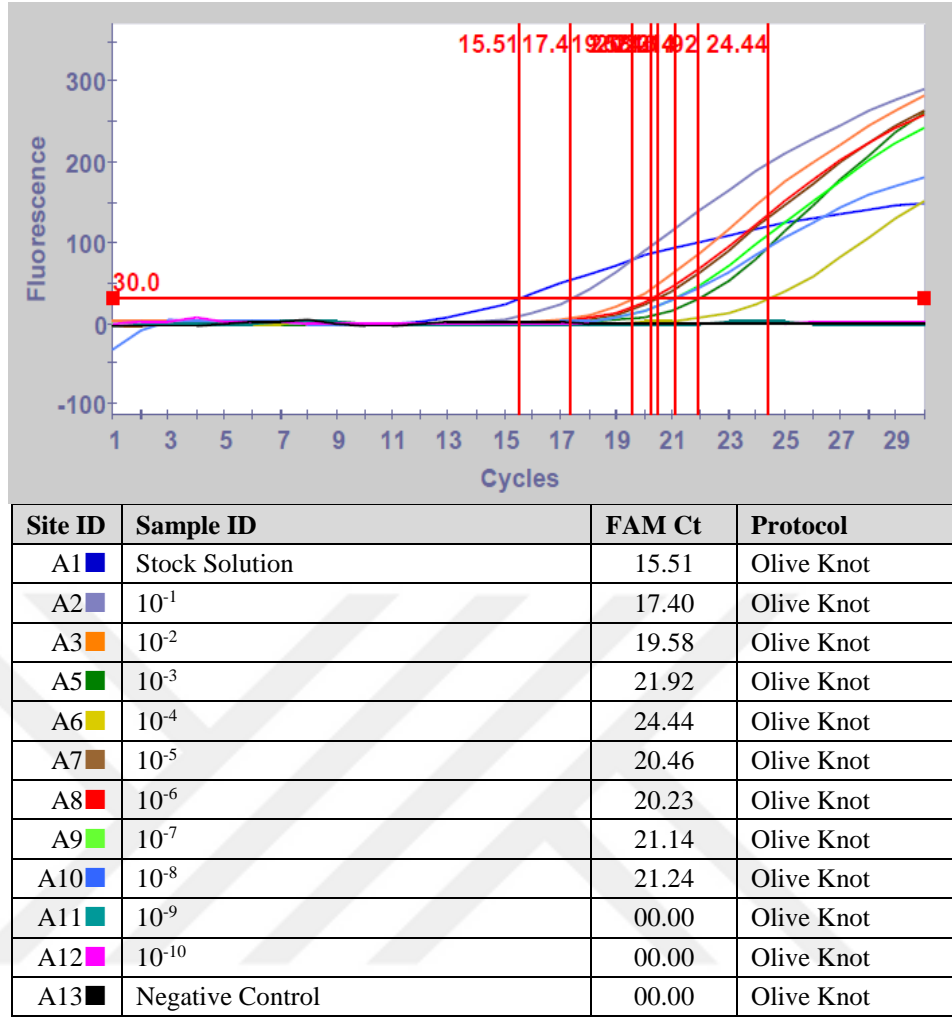
P/N: Pozitif/Negatif

$\bar{x}$ : Aritmetik ortalama





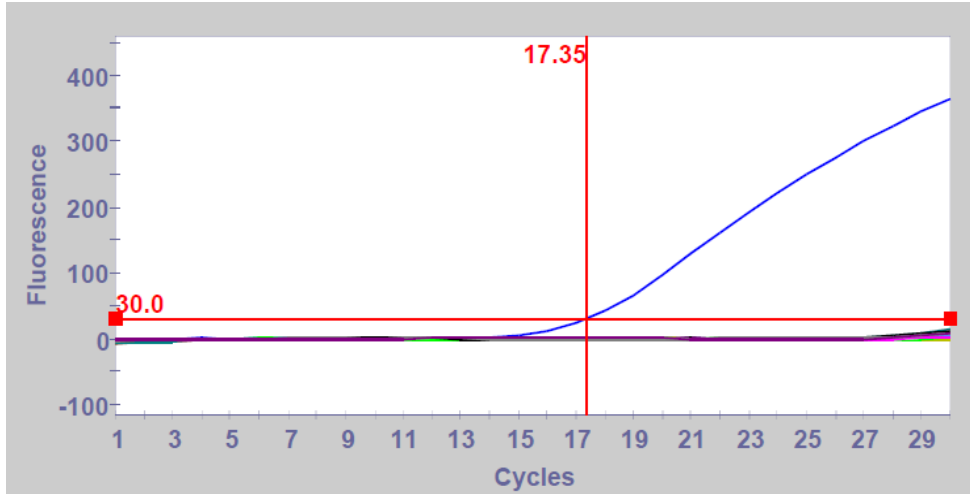
Şekil 4.6. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin Bakteri hassasiyet çalışmasında NA besi ortamında Stok- $10^{-10}$  seyreltmelerde tespit edilen en az bakterinin tespiti Stok (A),  $10^{-1}$  (B),  $10^{-2}$  (C),  $10^{-3}$  (D),  $10^{-4}$  (E),  $10^{-5}$  (F),  $10^{-6}$  (G),  $10^{-7}$  (H),  $10^{-8}$  (I),  $10^{-9}$  (J),  $10^{-10}$  (K) (Çizelge 4.1)



Şekil 4.7. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin bakteri hassasiyet tespiti

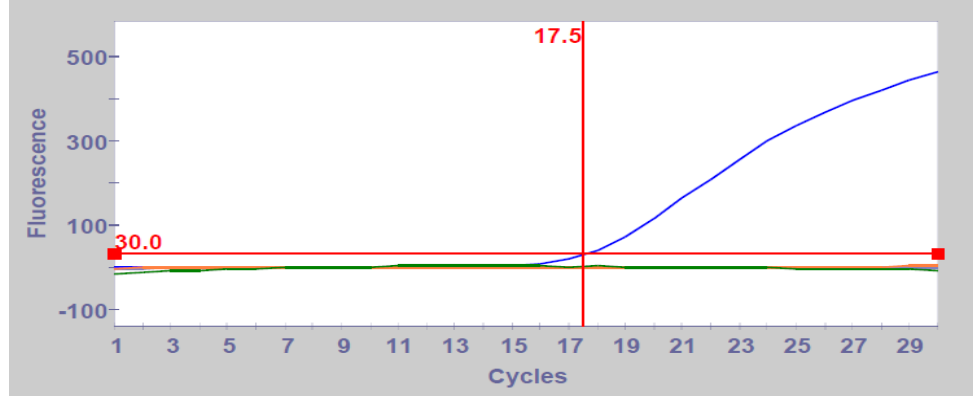
#### 4.6. Primer Seti ve Proben Seçiciliği

Zeytin dal kanseri patojeni tanı ve tespiti için tasarlanan primerler ve probun seçiciliğini test etmek amacıyla, geliştirilen primerler problar kullanılarak, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Çizelge 3.2) ve diğer bitki patojeni bakteriler (Çizelge 3.3) ile Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.8). Ayrıca geliştirilen primer prob seti *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* gibi urlar oluşturan *Rhizobium tumefaciens* ve *Rhizobium vitis*'e karşı test edilmiştir (Şekil 4.9). İşlem sonucunda, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* için tasarlanan primer prob setinin sadece *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* bakterisine spesifik olduğu belirlenmiştir.



Site ID	Sample ID	FAM Ct	Protocol
A1	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	17.35	Olive Knot
A2	<i>Acidovorax citrulli</i>	00.00	Olive Knot
A3	<i>Bacillus subtilis</i>	00.00	Olive Knot
A5	<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	00.00	Olive Knot
A6	<i>Erwinia amylovora</i>	00.00	Olive Knot
A7	<i>Dickeya chrysanthemi</i>	00.00	Olive Knot
A8	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	00.00	Olive Knot
A9	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	00.00	Olive Knot
A10	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	00.00	Olive Knot
A11	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	00.00	Olive Knot
A12	<i>Pseudomonas viridiflava</i>	00.00	Olive Knot
A13	<i>Xylella fastidiosa</i>	00.00	Olive Knot
A14	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	00.00	Olive Knot
A15	Negative Control	00.00	Olive Knot

Şekil 4.8. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin diğer bitki patojeni bakteri türlerine karşı spesifikliğinin belirlenmesi



Site ID	Sample ID	FAM Ct	Protocol
A1 ■	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	17.50	Olive Knot
A2 ■	<i>Rhizobium vitis</i>	00.00	Olive Knot
A3 ■	<i>Rhizobium tumefaciens</i>	00.00	Olive Knot
A4 ■	Negative Control	00.00	Olive Knot

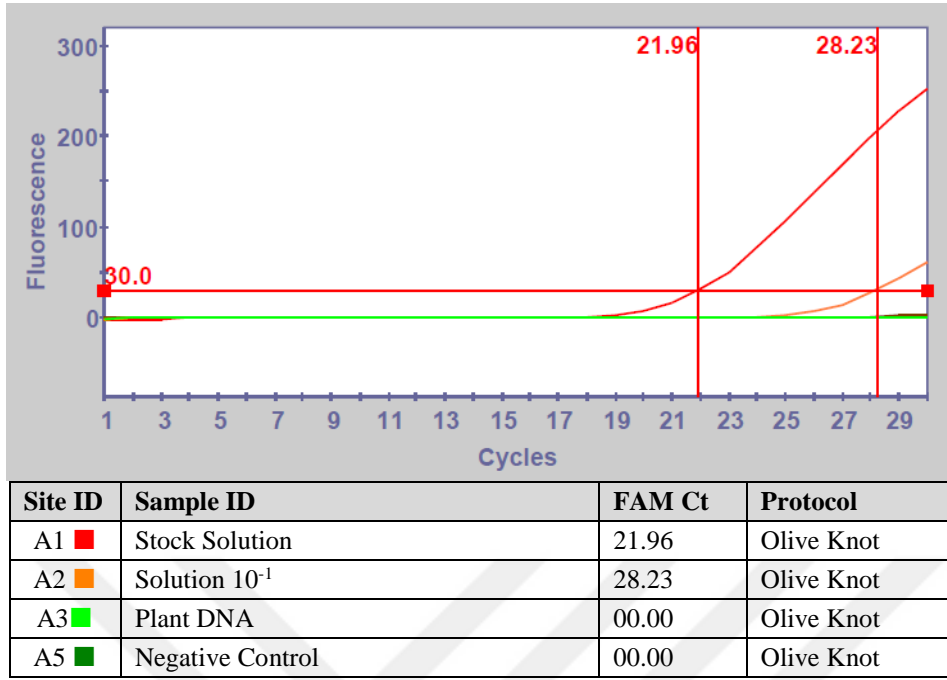
Şekil 4.9. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strainlerinin tespiti için tasarlanan primer ve prob setinin, ur oluşturan bakteriyel patojenlere karşı spesifikliğin belirlenmesi

#### 4.7. Real-Time PCR ile Hastalıklı Bitki Dokularından *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin Tespiti

Zeytin yetiştiriciliğinde ürün ve kalite kayıplarına sebep olan *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin Real-Time PCR ile direkt hastalıklı bitki dokularından tespiti için doğal enfekteli bir zeytin ağacından alınan, grimsi yeşil ur (Şekil 4.10) ezilerek hazırlanan stok solüsyondan ve 1/10 ( $10^{-1}$ ) oranında seyreltilmiş solüsyondan 2  $\mu$ l alınarak Real-Time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.11).



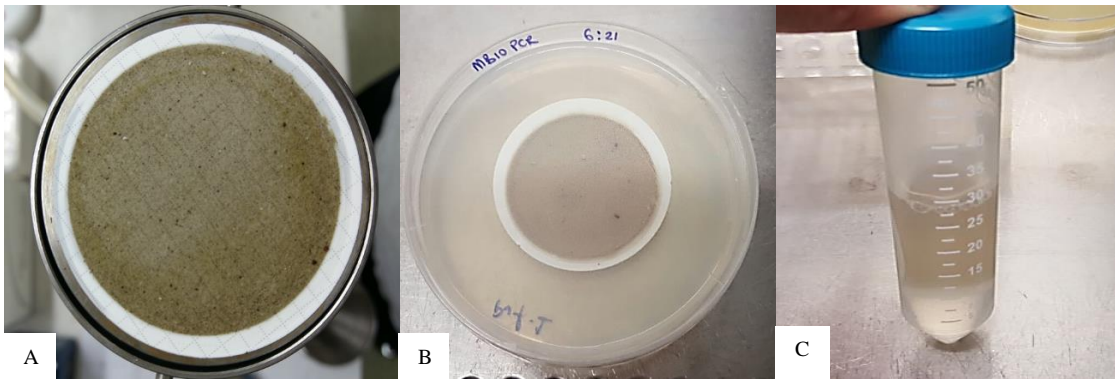
Şekil 4.10. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin oluşturduğu doğal enfekteli zeytin dalı (Bu çalışmadan)



Şekil 4.11. Tasarlanan primer ve prob seti ile *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin enfekteli bitki dokusundan tespiti

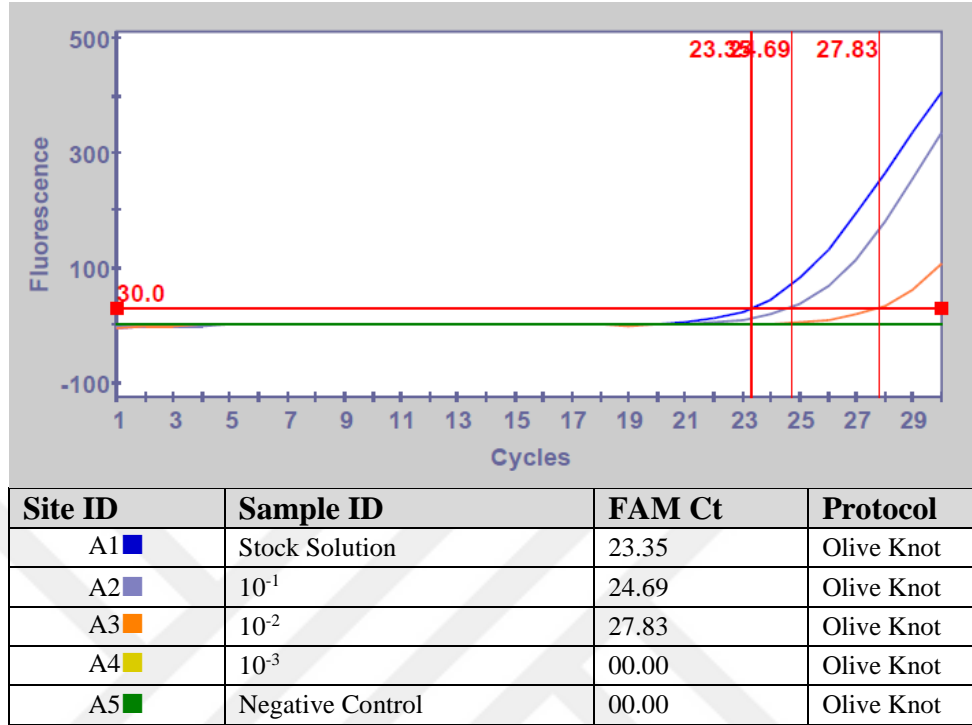
#### 4.8. Real-Time Membran Bio-PCR

Real-Time PCR yöntemi ile hem canlı ve hem de ölü bakterilerin tespiti mümkün olabilmektedir. Bu nedenle bu çalışmada yalnız canlı *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* popülasyonlarının tespitini gerçekleştirmek amacıyla Real-Time Membran Bio-PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Membran filtrelerdeki bakteriler yıkanarak stok solüsyon hazırlanmıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Membran Bio-PCR için stok solüsyon hazırlanması, membran filtre soğuk sterilizasyon aleti üzerinde (A), PVF-1 besi ortamı üzerinde (B), test tüpü içerisinde (C), (Bu çalışmadan)

Stok kültür,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  ve  $10^{-3}$  seviyeleri ile yapılan Real-Time Membran Bio-PCR işlemi sonucunda Stok kültür,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  seviyelerinde patojen (*Pss*) tespit edilebilmiştir (Şekil 4.13).

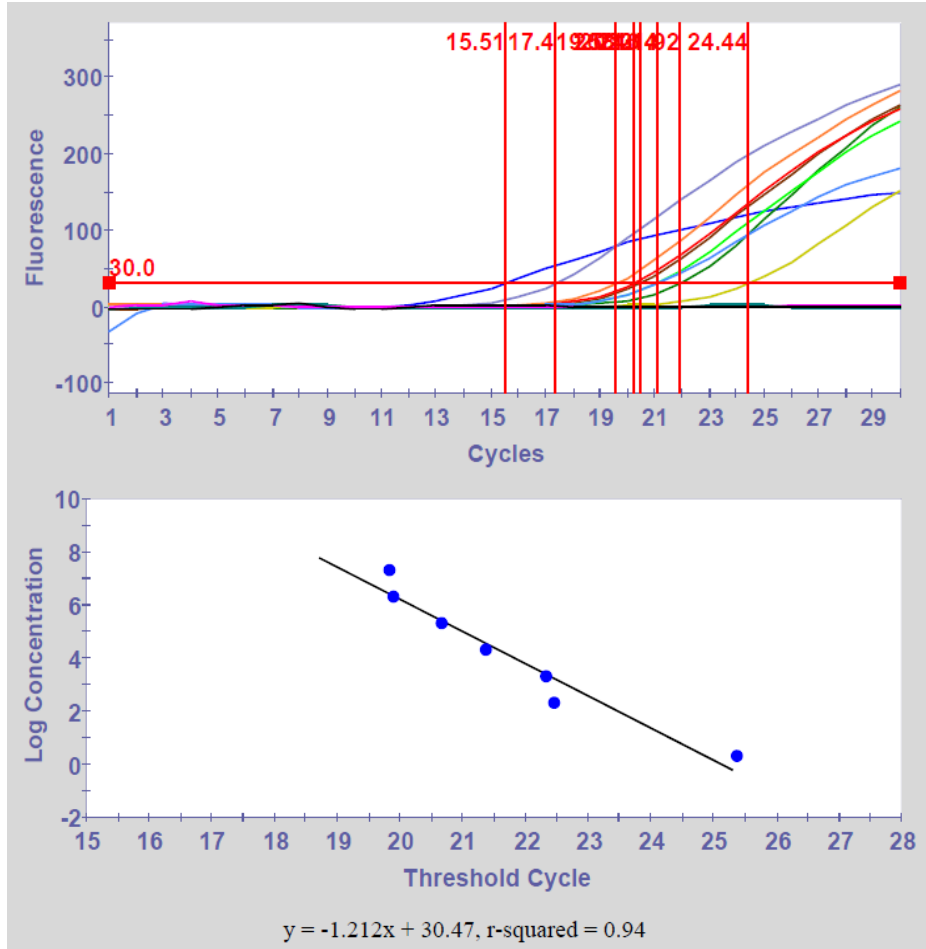


Şekil 4.13. Tasarlanan primer ve prob seti ve Real-Time Membran Bio-PCR yöntemi ile canlı *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin tespiti

#### 4.9. Kantitatif Real-Time Membran Bio-PCR ile Bitki Materyallerindeki Epifitik Bakteri Populasyon Değişimlerinin Belirlenmesi

Erken dönemde bitki materyallerinde bulunan epifitik bakterilerin sayısının belirlenmesi için Kantitatif Real-Time PCR işlemi ile referans standart eğri oluşturulmuştur. Bunun için hazırlanan stok çözeltiden  $10^{-1}$ ' den  $10^{-10}$ ' a kadar  $10^7$  un katları şeklinde seyreltme yapılmıştır. Hazırlanan seyreltmeler uygun besi ortamına yayılmış ve gelişen koloniler sayılmıştır. Sayım sonrası elde edilen veriler Kantitatif Real-Time PCR işlemi için "Olive Knot" programına kaydedilmiştir. Kantitatif Real-Time PCR işleminde oluşan amplifikasyon değerine bağlı olarak referans bir standart eğri oluşturulmuştur (Şekil. 4.14).





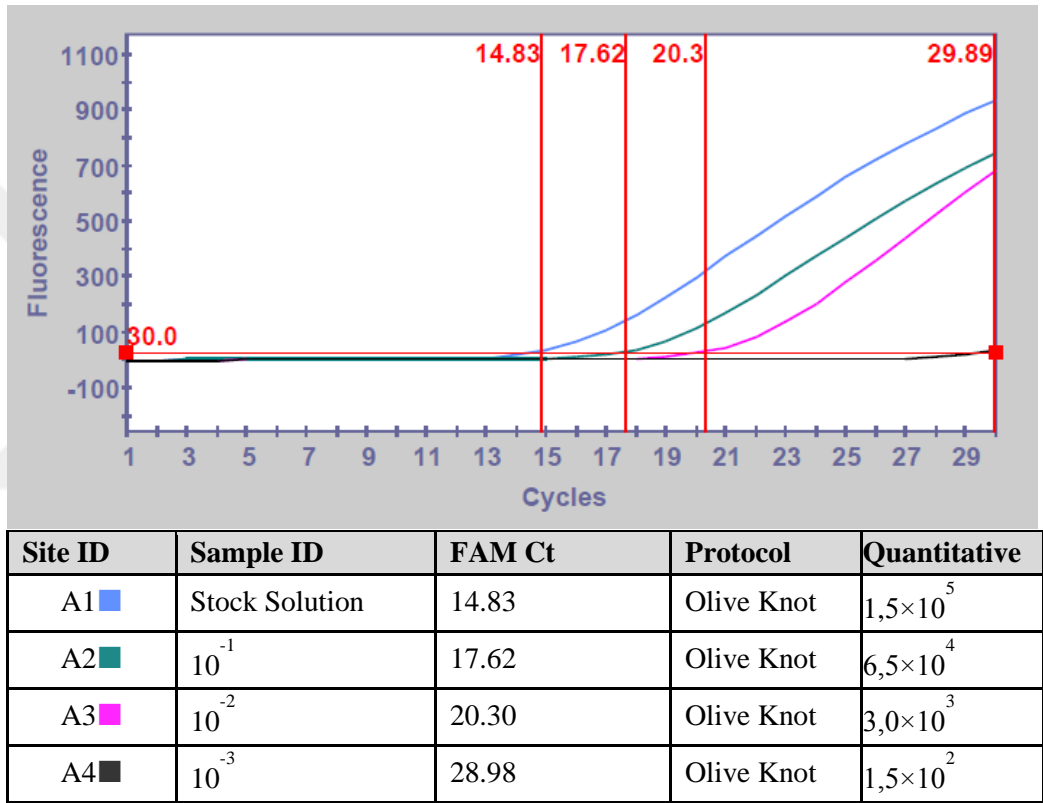
Site ID	Sample ID	FAM Ct	Protocol
A1	Stock Solution	15.51	Olive Knot
A2	$10^{-1}$	17.40	Olive Knot
A3	$10^{-2}$	19.58	Olive Knot
A5	$10^{-3}$	21.92	Olive Knot
A6	$10^{-4}$	24.44	Olive Knot
A7	$10^{-5}$	20.46	Olive Knot
A8	$10^{-6}$	20.23	Olive Knot
A9	$10^{-7}$	21.14	Olive Knot
A10	$10^{-8}$	21.24	Olive Knot
A11	$10^{-9}$	00.00	Olive Knot
A12	$10^{-10}$	00.00	Olive Knot
A13	Negative Control	00.00	Olive Knot

Data Type	Symbol
Unknown	■
Standard	●

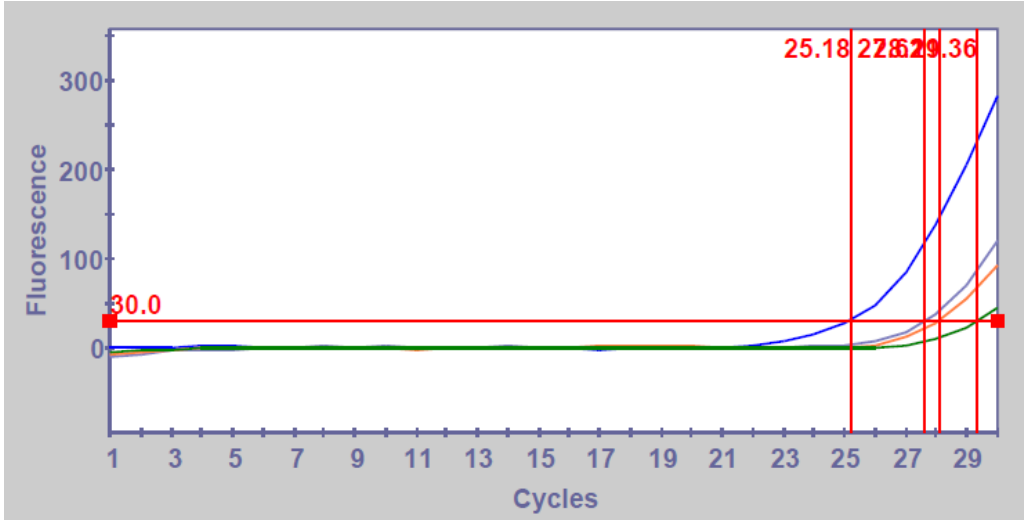
Şekil. 4.14. Kantitatif Real-Time PCR ile referans standart eğrinin oluşturulması

y: Bakteri sayısının logaritmik değeri x: Real-Time PCR sonrası saptanan Ct değeri

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin epifitik popülasyon değişimini örneklemek adına Antalya'nın 2 farklı lokasyonundaki (Kampüs-Döşemealtı) zeytin ağaçlarından örnekler alınmıştır. Kantitatif Real-Time Membran Bio-PCR prosedürü doğrultusunda filtrelerden geçirilmiş ve stok solüsyonlar hazırlanmıştır. Stok solüsyon,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  ve  $10^{-3}$  seviyelerinde seyreltilmiştir. Hazırlanan seyreltmeler uygun besi ortamlarına yayılmış ve gelişen koloniler sayılmıştır. Sayım sonrası elde edilen veriler Kantitatif Real-Time Membran Bio-PCR işlemi için "Olive Knot" programına kaydedilmiştir. Kantitatif Real-Time PCR işleminde oluşan amplifikasyon değerine bağlı olarak referans bir standart eğri oluşturulmuştur. Elde edilen referans standart eğriler değerlendirilerek bölgeler arasında, zeytin ağacı üzerindeki epifitik popülasyon yoğunlukları karşılaştırılabilmektedir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Kantitatif Real-Time Membran Bio-PCR ile epifitik popülasyonun sayısal olarak tespiti



Site ID	Sample ID	FAM Ct	Protocol	Quantitative
A1	Stock Solution	25.18	Olive Knot	$2 \times 10^4$
A2	$10^{-1}$	27.62	Olive Knot	$4,6 \times 10^3$
A3	$10^{-2}$	28.11	Olive Knot	$1,3 \times 10^2$
A4	$10^{-3}$	29.36	Olive Knot	$6,0 \times 10$

Şekil 4.16. Kantitatif Real-Time Membran Bio-PCR ile epifitik popülasyonun sayısal olarak tespiti

## 5. TARTIŞMA

Çok yönlü bir kültür bitkisi olarak Zeytin (*Olea europaea*) en eski tarım ürünlerinden biri olup, besleyici özellikleri çok kuvvetli olan, günümüzün hastalıkları kabul edilen kalp ve şeker gibi hastalıklara karşı koruyucu etkisi bulunan değerli bir besin maddesidir. Akdeniz tarzı beslenme üzerinde yapılan araştırmalar da zeytinin sağlık açısından önemini ortaya koymuştur. Zeytin ağacı, Dünya üzerindeki 30° – 45° enlemler arasında, beş kıtada, Kuzey ve Güney yarım kürede özellikle Akdeniz iklimine sahip bölgelere yayılmıştır. Akdeniz’de bulunan 8 ülke, dünya zeytinyağı üretiminin %90’dan fazlasını sağlamaktadır. Türkiye’nin önemli tarımsal ürünlerinden olan zeytin ve zeytinyağı, tarım sektörümüz için rekabet gücü yüksek ürünlerden biridir. Türkiye zeytin üretim alanı, toplam tarım alanlarının %2,3’ünü ve bağ-bahçe alanlarının ise %22’sini kapsamaktadır. Toplam 81 ilin %46’sında (36 il), 843 ilçenin ise %32’sinde (270 ilçe) zeytin üretimi yapılmaktadır (Öztürk vd 2009).

Zeytin ağaçlarında tek başına veya birlikte zarar yapan pek çok hastalık, zararlı ve yabancı ot bulunmaktadır. Bunlar gerek yağlık ve gerekse de sofralık zeytin üretimini azaltmaktadır. Bu hastalıklardan biri de zeytin yetiştirilen her alanda görülen *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*’nin neden olduğu Zeytin Dal Kanseri’dir.

Zeytin dal kanseri hastalığı, dallarda görülen hiperplastik semptomlarla karakterize edilmiştir. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*’nin sebep olduğu Zeytin Dal Kanseri endemik bir hastalık olup şiddetli yaprak dökümlerine ve zeytin ağaçlarının ölümüne sebep olabilmektedir (Varvaro ve Surico 1984). Dünyada zeytin yetiştirilen neredeyse her alanda görülmektedir. Bu hastalık kalite ve verimde önemli kayıplara sebep olmaktadır (Young vd 2004).

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* yara patojeni olup, bitki dokularına soğuk ve dolu yaraları, sıvrıkla yapılan hasat sırasındaki açılan yaralar, aşırı rüzgar sonucu oluşan yaralanmalar, böceklerin açtığı yaralardan girerek bitkilerin dal ve gövde kısımlarında hatta yapraklarında da görülebilen ırlar oluşturmaktadır. Bu yaralanmaların yanısıra patojenin bitkiye girişindeki önemli faktörlerden birisi de fungal etmen *Cyclogonium oleaginum*’un neden olduğu Halkalı Leke hastalığıdır. Belirtileri zeytin yaprakları üzerinde görülen siyahımsı-gri renkte yuvarlak noktalar şeklinde lekelerdir. Bu noktaların bulunduğu yerde renk açılır, daha sonra bunun çevresinde normal yaprak renginde bir halka oluşur. Bunu dıştan ikinci bir açık renkli halka çevirir. Sonra tekrar koyu renkli bir halka oluşur. Patojen zeytin yapraklarının yoğun bir şekilde dökülmesine neden olur. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* bu yaprak dökümleri sonucu oluşan yaralardan, halihazırda var olan epifitik popülasyonu sayesinde kolayca giriş yaparak Zeytin Dal Kanseri hastalığına sebep olmaktadır.

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*’nin İspanya (Alonso vd. 1988), Fas (Benjama vd. 1993), Ürdün (Tehabsim vd. 1991), Portekiz (Fernandes 1994, Marcelo vd. 1999), Yunanistan (Panagopoulos, 1993) Tunus (Boulila ve Mahjub 1994), ABD (Teviotdale 1994, Azad ve Cooksey, 1995), Avustralya’da (Hall 2004) ciddi verim kayıplarına sebep olduğu belirtilmektedir.

Karaca (1977)'de hastalığın Karadeniz, Marmara, Ege, Akdeniz ve Güney Doğu Anadolu'da görüldüğü fakat Ege ve Akdeniz bölgelerinde daha şiddetli olduğunu bildirmiştir. Türkiye'de bu hastalığın zeytinler üzerindeki etkisi uzun zamandır bilinmesine rağmen; ilk çalışmalar Ege bölgesinde Azeri (1993), Batı Akdeniz Bölgesinde Basım ve Ersoy (2000), Ersoy (2002), Aydın ve Muğla illerinde Tatlı ve Benlioğlu (2004), Doğu Akdeniz Bölgesinde Mirik vd (2004), Güneydoğu Anadolu Bölgesinde Kavak ve Üstün (2009), Adana, Samsun ve Tekirdağ'da Mirik vd (2011) tarafından yapılmıştır.

Ülkemiz, zeytin yetiştiriciliği bakımından hem ulusal olarak hem de uluslararası ölçülerde iklimsel ve coğrafik durumundan dolayı oldukça verimlidir. Ülkemizde zeytin üretimi tarım sektörünün önemli bir parçası olmakla birlikte üretim kapasitesini arttırmak için uygun çalışmalara ihtiyaç duyan bir sektördür. Batı Akdeniz Bölgesi'nde yapılan gözlem ve çalışmalar sonucu Zeytin Dal Kanseri hastalığı zeytinliklerde %80'e varan yüksek bir oranda görülmekte ve ekonomik olarak ürün kayıplarına neden olmaktadır (Basım ve Ersoy 2000).

Dünya'da ve ülkemizde geniş yayılış alanı bulan zeytin bitkisinin yetiştirildiği, hemen hemen her alanda görülen ve zeytin bitkisinin en önemli bakteriyel hastalığı olan Zeytin Dal Kanseri etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin günümüze kadar tanısı ve tespiti için pek çok yöntem geliştirilmiştir. *Pss*'nin tanısında, levan oluşumu, oksidaz reaksiyonu, patatesten pektolitik aktivite, arginin dehidrolaz, tütün yaprağında aşırı duyarlılık reaksiyonu (LOPAT) testlerinin yanı sıra Gram reaksiyon, 37 °C' de gelişim, PVF-1 yarı seçici besi yerinde gelişim (Surico ve Lavermicocca 1989), King B besi yerinde gelişim, jelatin hidrolizi, üreaz aktivitesi, trehaloz, erythritol, sellibioz, raffinöz, malik asit, sorbitol, sakkaroz, glycerol ve L-tartarik asitten asit oluşumu (Lelliott ve Stead 1987, Mohan ve Schaad 1987, Surico ve Lavermicocca 1989, Klement vd 1990, Schaad ve Frederick 2002) testleri geçmişten günümüze kullanılmaktadır.

Zeytin Dal Kanseri hastalığı etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, floresan *Pseudomonas* cinsleri için kullanılan LOPAT testleri ile fitopatogenik altgrup 1b içine dahil edilmiştir. *Pss* altgrup 1b içinde yer alan fitopatogenik *Pseudomonadlar* levan üretmemeleri ile altgrup 1a içinde olanlardan ayrılmıştır. Araştırmacılar İtalya'da 1990 yılında *Pss*'nin yaygınlığı üzerindeki çalışmaları sırasında, iki zeytin ağacından elde ettikleri *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* izolatlarının Levan pozitif olduklarını belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar iki üç yıl aradan sonra *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* popülasyonlarının levan üretim yaygınlığını belirlemek için çalışmalarına rastgele seçtikleri 39 zeytin bahçesini ilave etmişlerdir. Bu alanların yaklaşık %38'inde Levan pozitif bakteriler kaydedilmiştir. Levan pozitif bu bakterilerin fenotipik, genotipik ve patojenik karakterizasyonlar sonucu *Pss* olduğu kesinleştirilmiştir. Levan pozitif ve Levan negatif *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'lerin aynı zeytin bitkisi üzerinde *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'ye ait alt popülasyonlar olarak bir arada bulunabildiklerini belirlemişlerdir. Araştırmacılar sonuçlara göre, LOPAT şemasında 1a ve 1b alt gruplarının birleştirilmesini ve *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin hem Levan pozitif hem de Levan negatif bir bakteri türü olarak değerlendirilmesini önermişlerdir (Marchi vd 2005).

Besi ortamları, biyokimyasal test ve diğer testlerle yapılan tanılama çalışmaları sonuçları ile patojenik bakterilerin tanıları yapılabilir de bu yöntemlerin uzun zaman alması, bazı durumlarda kesin sonuç vermemesi, sonuçların değişkenliği ve bazı patojenlerin strainleri arasındaki farklılık nedeniyle kesin sonuçların alınması zorlaşmaktadır.

Patojenlerin tanısında PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) metodu daha hızlı ve güvenilir olmasından dolayı bitki patojenlerin tanısında kullanılmaktadır (Catara vd 2000, Catara vd 2002, Schaad vd 2002, Rameshkumar vd 2002, Kang vd 2003, Basım vd 2005, Guo vd 2007, Mavrodi vd 2007, Cottyn vd 2009, Cottyn vd 2011, Alimi vd 2011, Licciardello vd 2011, Heydari vd 2014).

Bakteriyel patojenlerin kesin tanı ve tespiti için son yıllarda Real-Time PCR yönteminden faydalanılmaktadır. Klasik PCR yöntemi, PCR işleminden sonra çoğaltılan DNA fragmentlerinin agaroz jelde yürütülmesi ve ethidium bromide ile boyanıp ultraviyole (UV) ışık altında görüntüleme gibi bir takım yan işlemlere ve uzun süreye gereksinim duymaktadır. Bu yöntemde, kesin sonuçlar elde edilmesine rağmen iş gücü ve zaman kayıpları fazla olmaktadır. Bu nedenle son yıllarda patojenlerin erken tanı ve tespitleri için klasik-PCR yönteminde yapılan agaroz jelde yürütme ve UV ışık altında DNA fragmentlerinin görüntülenmesi gibi ek işlemlere ihtiyaç duyulmadan daha kısa sürede, kesin sonuç elde edebileceğimiz Real-Time PCR yöntemi geliştirilmiştir (Schaad vd. 1999, Weller vd 2000, Wong ve Medrano 2005).

Real-Time PCR (RT-PCR) yöntemi, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı artış gösteren floresan sinyalin ölçülmesine dayanan ve oldukça kısa sürede sonuç veren bir PCR yöntemidir. Real-Time PCR yönteminde sonuçlar klasik PCR yöntemlerine oranla oldukça kısa sürelerde (20-35 dakika) ve kantitatif olarak elde edilmektedir. Real-Time PCR yönteminde klasik PCR metoduna nazaran daha az miktarda (1-2 µl) DNA kullanılarak daha hassas ve doğru sonuçlar elde edilmektedir. Real-Time PCR yönteminde tüm işlem kapalı bir PCR tüpü içerisinde ve tek seferde gerçekleştiği için kontaminasyon (bulaşma) riski klasik PCR metoduna göre çok daha düşüktür. Ayrıca Real-Time PCR sisteminde tüm PCR aşamaları bir bilgisayar ekranı aracılığı ile kontrol edilebilmekte ve işlem istenildiğinde durdurulabilmektedir. Real-Time PCR yönteminin klasik PCR yöntemine bir diğer üstünlüğü de kantitatif sonuçların daha güvenilir şekilde elde edilmesine imkan vermesidir (Schaad vd 1999, Weller vd 2000, Wong ve Medrano 2005, Pujol vd 2006, Mavrodi vd 2007, Basım ve Bozan 2011, Licciardello vd 2011, Cottyn vd 2011).

Real-Time PCR metodunun dezavantajları arasında bu yöntemin şu an için ekonomik olmaması, çoğaltılan ürünün daha sonraki çalışmalarda kullanılamaması, Real-Time PCR işlemi için SYBR Green gibi DNA'ya spesifik olmayan floresan boyaların kullanılması durumunda yanlış bağlanmalardan dolayı bazen tutarsız sonuçlar elde edilmesi, yeterli teknik bilgi ve iyi yetişmiş eleman ihtiyacı duyması gösterilebilir.

Hastalık etmenleri ile mücadelede başarılı olabilmek için hastalık etmenlerinin hızlı, güvenilir ve erken dönemde tanı ve tespitlerinin yapılması önemlidir. Çalışmada Prob olarak günümüzde kullanılan prob sistemlerinden biri olan LNA (Locked Nucleic Acid) prob kullanılmıştır. LNA prob sisteminde prob üzerinde yer alan DNA analogu

monomerlerde bulunan şeker halkaları metilen bir köprü ile bağlandığından monomerlerin her biri spesifik bağlanma için en uygun konformasyon olan N konformasyonunda sabit kalabilmektedirler. Bu sayede kullanılan problar stabil olabilmektedir. Bu özellik spesifik olmayan bağlanmalara izin vermemekte ve problemlerin spesifik bölgelere olan bağlanmalarını arttırmaktadır. LNA problemlere ait diziler tasarımları gereği Real-Time PCR ile yapılan diğer çalışmalarda kullanılan problemlerin dizilerinden uzunluk olarak daha kısadır. Bu sayede prob dizisinin kendi içinde bağlanma olasılığı ortadan kalkmaktadır. Problemlerin ve amplifiye edilen bölgenin kısa dizilerden oluşması amplifikasyon işleminin daha kısa sürede gerçekleşmesine olanak vermektedir. LNA probun kimyasal yapısı daha spesifik olarak çalışmasını ve alınan sonuçların daha hızlı ve güvenilir olmasını sağlamaktadır. Bu çalışma ile LNA problemler kullanılarak Real-Time PCR yönteminin önemi ve hassaslığı bir kez daha ortaya konulmuştur.

Real-Time PCR yönteminin kolay uygulanabilir olması, tanı ve tespitlerin hızlı, güvenilir ve hassas şekilde gerçekleştirilebilmesi, direkt hastalıklı bitki materyallerinden tespit yapılabilmesi, bitki patojeni bakterilerin tanı ve tespitlerini gerçekleştirmek amacıyla son yıllarda yöntemin kullanımının giderek yaygınlaşmasında önemli rol oynamaktadır. Real-Time PCR ile günümüze kadar farklı bitki patojeni bakterilerin tanı ve tespitleri yapılmıştır (Schaad vd 1999, Freeman vd 1999, Weller vd 2000, Salm ve Geider 2004, Basım ve Basım 2004, Cubero ve Graham 2005, Berg vd 2006, Basım ve Yılmaz 2005, Pujol vd 2006, Basım ve Basım 2007, Bellis vd 2007, Mavrodi vd 2007, Benlioğlu ve Özyılmaz 2007, Dreo vd 2007, Luo vd 2008, Basım ve Basım 2009, Basım ve Çaplık 2009, Gottsberger 2010, Basım ve Bozan 2011, Basım ve Öztürk 2011, Licciardello vd 2011, Cottyn vd 2011, Johnson ve Walcott 2012, Gallelli vd 2014,).

*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* etmeninin tanı ve tespitinde kullanılan 30-35 döngülük klasik PCR yöntemleri, 100-155 dakikada tamamlanırken bu çalışmada optimize edilen 30 döngülük Real-Time PCR yöntemi ile 34 dakikada tamamlanmaktadır. Ayrıca Real-Time PCR sistemi PCR işleminin bir bilgisayar aracılığı ile gerçek zamanlı olarak kontrol edilebilmesine ve işlemin istenildiğinde sonlandırılmasına olanak verdiğinden; sonuç döngülerin tamamlanmasından önce elde edilebilmektedir. Bu çalışmada dizayn edilen primer seti ve prob kullanılarak, Real-Time PCR yöntemi ile *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin yaklaşık 22 dakikada tanı ve tespiti gerçekleştirilmiştir.

Klasik PCR yönteminde tespitinin gerçekleştirilmesi için ortamda bulunması gereken bakteri yoğunluğu genellikle  $5 \times 10^2$  ve  $1 \times 10^4$  cfu/ml arasında değiştiği rapor edilmiştir (Cottyn vd 2011). Bu çalışmada geliştirilen yöntemin bakteriyel hücre hassasiyet sınırı *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* için 2 hücre, olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen yöntemin DNA düzeyindeki hassasiyet sınırı ise 11.8 pg düzeyine kadar tespit edilmiştir. Bu çalışmada geliştirilen Real-Time PCR metodu ile kullanılan LNA probu genomdaki çoğalan kısmın seçicilik, hassaslık ve tekrarlanabilirliğini sağlamıştır. Bunun yanında, Real-Time PCR, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin direkt hastalıklı zeytin bitkilerinden tespiti başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Direkt bitki dokusundan tanı ve tespit imkânı, Real-Time PCR işleminin sağlıklı sonuç vermesi için bakteriyel izolasyonun yapılması gerekliliğini ortadan kaldırmış, sistemin uygulanabilirliğini ve hızını büyük ölçüde arttırmıştır. Bitki patojeni bakterilerin tanı ve tespitlerini taşınabilir Real-Time PCR cihazları ile

yapılabilme olanağı, hedef patojenlerin dışındaki bitki patojenlerinin laboratuvara taşınmasının ve kültüre alınmasının önüne geçebilecektir.

Çalışmada kullanılan bir diğer yöntem Kantitatif Real-Time Membran Bio PCR'dır. Bu yöntemle *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin zeytin bitkileri üzerinde bulunan ve yeni enfeksiyonlar için inokulum kaynağı olan epifitik popülasyonu üzerinde çalışılmıştır. Zeytin ağacı üzerindeki epifitik popülasyon canlı ve ölü bakterileri bir arada içermektedir. Yöntemin amacı, bakterilerin geçemeyeceği membran filtreler kullanarak, uygun inkübasyon şartları ve süresinde, bu filtreler üzerinde, sadece canlı *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* kolonileri elde etmek ve Real-Time PCR ile kantitatif olarak tespitini yapmaktır. Bu sayede zeytin ağaçları üzerinde var olan epifitik popülasyon içinde, hastalığa sebep olabilecek canlı bakteriler tespit edilebilecektir. Aynı zamanda bu yöntem belirli aralıklarla uygulanarak Zeytin Dal Kanseri hastalığının ortaya çıkış dönemlerini belirlemeye yardımcı olacaktır.





## 6. SONUÇ

Zeytin yetiştiriciliğinin ilk insanlarla birlikte başladığı kabul edilmekte ve “Zeytin bütün ağaçların ilkidir.” denilmektedir. Tüm Dünyada bulunan 900 milyon zeytin ağacından %98’ i Akdeniz bölgesinde yer almaktadır. Zeytin ve zeytinyağı aynı zamanda Akdeniz’i simgeleyen bir kültürün de parçasıdır. Zeytin meyvesi yağlık ve sofralık olarak işlenebilen tarımsal bir ürün olmasının yanı sıra, zeytinyağına ve salamuraya işlenmesi nedeniyle de tarıma dayalı sanayi ve ihracatta vazgeçilmez ürünler arasında yer almaktadır. Türkiye’nin önemli tarımsal ihraç ürünlerinden biri olan zeytin ve zeytinyağı, ülkemiz potansiyeli dikkate alındığında, mevcut sorunların çözüme kavuşturulmasıyla özellikle de Avrupa Birliğine katılım sürecinde, tarım sektörümüz için rekabet gücü yüksek olan ürünlerden birisidir.

Zeytin yetiştiriciliğinde mevcut sorunlardan biri de Dünya’da zeytin yetiştiriciliği yapılan her alanda görülen, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (ex Smith) (Gardan 1992a)’nin neden olduğu, Zeytin Dal Kanseri hastalığıdır. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*’nin sebep olduğu Zeytin Dal Kanseri endemik bir hastalık olup şiddetli yaprak dökümlerine ve zeytin ağaçlarının ölümüne sebep olabilmektedir. Bununla beraber, ürün kaybı ve kalite düşüklüğüne sebep olmaktadır.

Bu doğrultuda Zeytin Dal Kanseri hastalığı patojeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* bu çalışmada ele alınmış, bu patojenin hızlı tanı ve tespiti için etkili, hassas ve kesin sonuç elde edilebilen Real-Time PCR yöntemi geliştirilmiştir. Tanı ve tespitlerde uygulanan PCR protokolleri optimize edilerek analizin yaklaşık 15 - 20 dakika içinde sonuçlanabilir niteliğe kavuşması sağlanmıştır. Termal erime eğrisi ile primer seti ve prob ile gerçekleştirilen amplifikasyonların tek bir diziyeye spesifik olduğu gösterilmiştir. Prob ve primerlerin sadece *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*’ye ait DNA dizisine uygun olduğu için, farklı *Pss* strainlerinin test edilmesi sırasında amplifikasyonun meydana geldiği, fakat farklı bitki patojeni bakterilerin DNA dizisiyle uyuşmadığı için amplifikasyonun meydana gelmediği ortaya konmuştur. Bu uygulamanın amacı, primer seti ve probun sadece *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*’ye spesifik olduğunu ortaya koymaktır. Böylece hastalıklı bir bitki materyalinin analizi yapılırken materyal başka bir bakteriyle bulaşık dahi olsa amplifikasyon oluşumunun meydana gelmeyeceği belirlenmiştir. Geliştirilen primer seti ve prob *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*’nin diğer strainleriyle de uyuştuğunu ortaya koymak için ise farklı bölgelerden toplanan hastalıklı bitki örneklerinden izole edilmiş olan ve şu an Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Fitopatoloji Anabilim Dalı, Bakteriyoloji Laboratuvarında Prof. Dr. Hüseyin BASIM’a ait kültür stoklarında yer alan *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strainleri üzerinde test edilmiştir. Test sonucunda meydana gelen amplifikasyonla farklı strainlerin de tespitinin yapılabileceği belirlenmiştir.

Yeni enfeksiyonlar için inokulum kaynağı genç tümörlerde yaşayan *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* popülasyonu tarafından sağlanır ve aynı zamanda *Pss* doğal olarak sağlıklı zeytin ağaçlarında yaprak yüzeyinde, dal yüzeyinde, gövdede ve meyvede epifitik olarak bulunmaktadır. Epifitik popülasyonun düşük yoğunluklarda olduğu durumlarda veya hastalığın ilk aşamalarındaki düşük yoğunluklarda da tespit edilebildiğini kanıtlamak amacıyla farklı seyreltmeler hazırlanarak, bu seyreltmeler *Pss*’ye spesifik olarak tasarlanan primerler ve prob kullanılarak Real-Time PCR’da test edilmiştir. Geliştirilen Real-Time PCR yöntemleriyle bakteriyel hücre hassasiyet sınırı, 2

hücre olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen yöntemin DNA düzeyindeki hasasiyet sınırı ise 11,8 pg. düzeyine kadar tespit edilmiştir. Bu çalışmada, Real-Time PCR metodu ile kullanılan LNA prob genomdaki çoğalan kısmın seçicilik, hassaslık ve tekrarlanabilirliğini sağlamıştır.

Real-Time PCR yöntemin kolaylığı, tanı ve tespitlerin hızlı, güvenilir ve hassas şekilde gerçekleştirilebilmesi, direkt bitki dokularından tespit yapılabilmesi, bitki patojeni bakterilerin tanı ve tespitlerini gerçekleştirmek amacıyla son yıllarda yöntemin kullanımının yaygınlaşmasında önemli rol oynamıştır. Bu çalışma ile Real-Time PCR yönteminin önemi ve hassaslığı bir kez daha ortaya konulmuştur.

Real-Time PCR yöntemi canlı ve ölü bakterileri birlikte tespit etmektedir. Yeni enfeksiyonlar için inokulum kaynağı olan epifitik popülasyon içerisindeki, sadece canlı bakterilerin tespit edilmesi ve yoğunluklarının kantitatif olarak belirlenebilmesi amacıyla Kantitatif Real-Time Membran Bio-PCR yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntem ile Antalya Merkez içerisindeki farklı lokasyonlardaki epifitik popülasyon yoğunlukları belirlenebilmiştir. *Pss*'nin Zeytin Dal Kanseri hastalığını oluşturmadaki en önemli faktörlerinden biri olan epifitik popülasyonun, bitki üzerindeki varlığının tespit edilebilmesi, etkin olarak ilaçlı mücadelesi bulunmayan bu hastalığın önlenmesinde oldukça önemlidir. Epifitik popülasyonun zamana bağlı yoğunluk değişimleri kantitatif olarak belirlenebilecek, hastalığın ortaya çıkış dönemleri kesin olarak saptanabilecektir. Çalışma, bu yönüyle Zeytin Dal Kanseri hastalığının epidemiyolojisine katkı sağlayacaktır.

Bu çalışmada geliştirilen Kantitatif Real-Time Membran Bio-PCR yöntemi ile *Pss*'nin hastalıklı bitki dokularından, arazi koşullarında dahi tespitinin kolay ve pratik bir şekilde yapılması mümkün olabilecektir. *Pss*'ye ait çok sayıda izolatin elde edilebilmesine katkı sağlayacaktır. Farklı izolatlarla, daha sonra yapılacak çalışmalarda, genotipik farklılıkların ortaya konmasıyla patojenlerin farklı strainleri doğru olarak elde edilebilecektir. Böylelikle ileride Zeytin Dal Kanserine karşı yapılacak bitki dayanıklılık çalışmalarında bu farklı strainlerin kullanılması büyük önem taşımaktadır. Bu çalışma, *Pss*'nin kısa sürede, kesin tanısına ve ilerideki çalışmalarda farklı strainlerin elde edilmesine, olanak sağlayacak olması bakımından önem taşımaktadır. Yöntem *Pss*'nin yanı sıra, epifitik olarak bulunabilen diğer bitki patojeni bakterilerin tespitiyle ilgili yapılacak bilimsel çalışmalara hem teorik yönden hem de pratik yönden önemli katkılar sağlayabilecektir.

## KAYNAKÇA

- AGALIAS, A., MAGIATIS, P., SKALTSOUNIS, A.L., MIKROS, E., TSARBOPOULOS, A., GIKAS, E. and MANIOS, T. 2007. A new process for the management of olive oil mill waste water and recovery of natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (7): 2671-2676.
- ALONSO, E.J., ANCHEZ E., ANEHES QUÍNTANA R. B. and LOBET L. 1988. Relation between the presence of plasmids and indoleacetic acid synthesis in strains of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. Omunicaciones del III ongre o acional de Fitopatologia. *Puerto de la Ruz (Terierife-i las anarias)*.
- AMIOT, M. J., FLEURIET, A. and MACHEIX, J. J. 1989. Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry*, 28 (1): 67-69.
- ANONIM, 2010 <http://www.yaklasansaat.com/dunyamiz/canlilar/zeytin.asp> (Son erişim tarihi: 20.03.2017)
- ANONIM, 2011 <https://www.tariszeytinyagi.com/> (Son erişim tarihi: 20.03.2017)
- ANONIM, 2014-a <https://tarimsaati.wordpress.com/category/zeytin/> (Son erişim tarihi: 14.04.2017)
- ANONIM, 2015 [http://colbanzeytin.com/TR/pages/Zeytin\\_Dunyada.html](http://colbanzeytin.com/TR/pages/Zeytin_Dunyada.html) (Son erişim tarihi: 11.04.2017)
- ANONIM, 2014-b <http://www.exiqon.com> (Son erişim tarihi: 12.09.2014)
- ANONIM, 2017-a <https://tr.wikipedia.org/wiki/Zeytin> (Son erişim tarihi: 26.04.2017)
- ARDA, M. 1994. Biyoteknoloji (Bazı Temel İlkeler). II. Baskı. Ankara: Kükem Derneği Bilimsel Yayınları. No:2
- ATALLAH, Z.K. and STEVENSON, W.R. 2006. A methodology to detect and quantify five pathogens causing potato tuber decay using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 96 (9): 1037-1045.
- AZAD, H.R. and COOKSEY, D.A. 1995. A semiselective medium for detecting epiphytic and systemic populations of *Pseudomonas savastanoi* from oleander. *Phytopathology*, 85 (7): 740-745.
- AZERI, T. 1993. Research on olive leaf spot, olive knot and *Verticillium* wilt of olive in Turkey I. *EPPO Bulletin*, 23 (3): 437-440.

- BASIM, H. ve BAKI, D. 2014. Domates (*Solanum Lycopersicum* L.) bakteriyel öz nekrozu hastalık etmenleri *Dickeya Chrysanthemi*, *Pectobacterium Carotovorum* Subsp. *Carotovorum*, *Pseudomonas Cichorii*, *Pseudomonas Corrugata*, *Pseudomonas Fluorescens*, *Pseudomonas Mediterranea* ve *Pseudomonas Viridiflava*'nın LNA probe kullanılarak Real-Time PCR ile tanısı ve Hastalıklı bitki dokularından tespiti. Yüksek lisans tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 155 s.
- BASIM, E. ve BASIM, H. 2004. Multiplex-Bio PCR ile domates bakteriyel patojenlerinin moleküler tanısı. Türkiye I Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, ss. 144, 8-10 Eylül, Samsun.
- BASIM, H., BASIM, E., YILMAZ, S. and ILKUÇAN, M. 2005. First report of pith necrosis of tomato caused by *Pseudomonas mediterranea* in Turkey. *Plant Pathol.*, 54: 240.
- BASIM, H. ve BASIM, E. 2007. "TaqMan Real-Time PCR ile *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'nun tanısı ve tespiti", II. Bitki Koruma Kongresi, ss. 104, 27-29 Ağustos, Isparta.
- BASIM, E. ve BASIM, H. 2009. Batı Akdeniz Bölgesi'ndeki bağ alanlarında Pierce Hastalığı etmeni *Xylella fastidiosa*'nın tanısı, tespiti ve moleküler karakterizasyonu. Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi, ss. 156, 15-18 Temmuz, Van.
- BASIM, H. ve BOZAN, G. 2011. Ateş yanıklığı hastalık etmeni *Erwinia amylovora*'nın LNA probe kullanılarak kantitatif Real-Time PCR ile tanısı ve tespiti. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 92 s.
- BASIM, H. ve ÇAPLIK, D. 2009. Domates Bakteriyel Kanser etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve Domates Bakteriyel Yaprak Lekesi etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın LNA probe'a dayalı Real-Time PCR ile tanısı ve saptanması. Türkiye III. Fitopatoloji Kongresi, ss. 138, 15-18 Temmuz, Van.
- BASIM, H. ve ERSOY, A. 2000. Batı Akdeniz Bölgesinde zeytin ağaçlarında *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* tarafından oluşturulan bakteriyel dal kanseri hastalığının yayılışı ve hastalık etmeninin tanısı. *Türkiye I. Zeytincilik Sempozyumu*, 310-315.
- BASIM, H. ve OZTURK, N. 2011. Fasulye Bakteriyel Yaprak Yanıklık (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) ve Bakteriyel Hale Lekesi (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*) etmenlerinin LNA probu kullanılarak Real-Time PCR ile tespiti ve tanılanması. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi, ss. 59, 28-30 Haziran, Kahramanmaraş.

- BAZOTI, F.N., J. BERGQUIST, K.E. MARKIDES and TSARBOPOULOS, A. 2006. Noncovalent interaction between amyloid- $\beta$ -peptide (1-40) and oleuropein studied by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 17: 568–75.
- BEAUCHAMP, G.K., KEAST, R.S., MOREL, D., LIN, J., PIKA, J., HAN, Q. and BRESLIN, P.A. 2005. Phytochemistry: ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature*, 437 (7055): 45-46.
- BENJAMA, A. M. ATBI H. TAHIRI, and A. AZNAD, 1993. The present situation with olive knot disease in the Zerhoun region of Morocco. *Al Awamia*, No: 8 , 153-160p.
- BELLA, P., CATARA, V., SUTRA, L., GUARINO, G., CIRVILLERI, G. and GARDAN, L. 2003. Phenotypic characteristics of *Pseudomonas savastanoi* strains from various hosts. in *Pseudomonas syringae* and related pathogens. pp. 681-686, Springer Netherlands.
- BELLIS, P.D., SCHENA, L., CARIDDI, C. 2007. Real-time Scorpion-PCR detection and quantification of *Erwinia amylovora* on pear leaves and flowers. *Eur. J. Plant. Pathol.*, 118: 11-22.
- BENLIOĞLU, K., OZYILMAZ, U. 2007. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in Moleküler Beacon Probe ve Fluoresan PCR Testi ile saptanması, Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi, ss. 103, 27-29 Ağustos, Isparta.
- BERG, R.J., KUIJPER, E.J., COPPENRAET, L.E.S. and CLAAS, E.C.J. 2006. Rapid diagnosis of toxinogenic *Clostridium difficile* in faecal samples with internally controlled Real- Time PCR. *Clinical Microbiology and Infection*, 12 (2): 184-186.
- BERTOLINI, E., PENYALVER, R., GARCIA, A., OLMOS, A., QUESADA, J.M., CAMBRA, M. and LÓPEZ, M.M. 2003. Highly sensitive detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in asymptomatic olive plants by nested-PCR in a single closed tube. *Journal of Microbiological Methods*, 52 (2): 261-266.
- BONAS, U. 1994. *Hrp* genes of phytopathogenic bacteria. In *Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals* (pp. 79-96). Springer Berlin Heidelberg.

- BOUAZIZ, M., FKI, I., JEMAI, H., AYADI, M. and SAYADI, S. 2008. Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Food Chemistry*, 108 (1): 253-262.
- BOULILA, M. and MAHJOUB, M. 1994. Inventory of olive disease in Tunisia. *Bulletin OEPP*, 24(4): 817-823.
- BOZKURT, I.A., SOYLU, S., MIRIK, M., ULUBAS SERCE, C. ve BAYSAL, Ö. 2014. Characterization of bacterial knot disease caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* on pomegranate (*Punica granatum* L.) trees: a new host of the pathogen. *Letters in Applied Microbiology*, 59 (5): 520-527.
- BRADBURY, J. F. 1986. *Guide to plant pathogenic bacteria*. CAB International 73 pp.
- BRAUN, P., OCKHUIJSEN, C., EPPENS, E., KOSTER, M., BITTER, W. and TOMMASSEN, J. 2001. Maturation of *Pseudomonas aeruginosa* elastase formation of the disulfide bonds. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (28): 26030-26035.
- BUCKINGHAM, L. 2011. *Molecular diagnostics: fundamentals, methods and clinical applications*. FA Davis. II. ed. 978-981 pp.
- CANÖZER, Ö. 1991. Standart zeytin çeşitleri kataloğu. *TC Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Mesleki Yayınlar Serisi, Genel*, (334).
- CAPONERO, A., CONTESINI, A.M. and IACOBELLIS, N.S. 1995. Population diversity of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* on olive and oleander. *Plant Pathology*, 44 (5): 848-855.
- CARLUCCIO, M.A., L. SICULELLA, M.A. ANCORA, M. MASSARO, E. SCODITTI, C. STORELLI, F. VISIOLI, A., DISTANTE and DECATERINA., R. 2003. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 23: 622–629.
- CATARA, V., ARNOLD, D.L., CIRVILLERI, G., BELLA, P. and VIVIAN, A. 2000. Specific oligonucleotide primers for the rapid identification and detection of *Pseudomonas corrugata*, by PCR amplification: Evidence for two distinct genomic groups. *Eur. J. Plant. Pathol.*, 106: 753-762.
- CATARA, V., SUTRA, L., MORINEAU, A., ACHOUAK, W., CHRISTEN, R. and GARDAN, L., 2002. Phenotypic and genomic evidence for the revision of

*Pseudomonas corrugata* and proposal of *Pseudomonas mediterranea* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 52: 1749-1758.

CAYUELA, J.A., RADA, M., RIOS, J.J., ALBI, T. and GUINDA, A. 2006. Changes in phenolic composition induced by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* infection in olive tree: presence of large amounts of verbascoside in nodules of tuberculosis disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (15): 5363-5368.

COMAI, L. and KOSUGE, T. 1980. Involvement of plasmid deoxyribonucleic acid in indoleacetic acid synthesis in *Pseudomonas savastanoi*. *Journal of Bacteriology*, 143 (2): 950-957.

COMAI, L. and KOSUGE, T. 1982. Cloning characterization of *iaaM*, a virulence determinant of *Pseudomonas savastanoi*. *Journal of Bacteriology*, Am Soc Microbiol. 63 (3): 264-276.

CONNER, K. N., OLIVE, J., ZHANG, L., JACOBI, J. and PUTNAM, M. L. 2014. First report of bacterial gall on *Loropetalum chinense* caused by *Pseudomonas savastanoi* in the United States. *Letters in Applied Microbiology*, 59 (5): 520-527.

COTTYN, B., HEYLEN, K. and HEYRMAN, J. 2009. *Pseudomonas cichorii* as causal agent of midrib rot, an emerging disease of greenhousegrown butter head lettuce in Flanders. *Syst. Appl. Microbiol.*, 32: 211-25.

COTTYN, B., BAEYEN, S., PAUWELYN, E., VERBAENDERT, I., DE VOS, P., BLEYAERT, P. and MAES, M. 2011. Development of a real-time PCR assay for *Pseudomonas cichorii*, the causal agent of midrib rot in greenhouse-grown lettuce, and its detection in irrigating water. *Plant Pathology*, 60 (3): 453-461.

CUBERO, J. and GRAHAM, H.J. 2005. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction for bacterial enumeration and allelic discrimination to differentiate *Xanthomonas* strains on citrus. *Phytopathology*, 95 (11): 1333-1340.

ÇAVUŞOĞLU, A. and ÇAKIR, M. 1988. FAO “Modern Olive Growing”(Modern zeytincilik). 33 s.

DA SILVA, D. P., DEVESCOVI, G., PASZKIEWICZ, K., MORETTI, C., BUONAURIO, R., STUDHOLME, D. J. and VENTURI, V. 2013. Draft genome sequence of *Erwinia toletana*, a bacterium associated with olive knots caused by

- Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Genome Announcements*, 1 (3): 205-213.
- DENK, G. 2004. Zeytinyağı Sektör Profili Araştırması, Türkiye 6-12 s.
- DOĞAKA. 2015. Akdeniz, D. Kalkınma Ajansı 2015. Yılı Ara Faaliyet Raporu. 8-14 s.
- DURLU-OZKAYA, F. 2008. Zeytinyağı ile zeytin yaprağının mutfakta ve diğer alanlarda kullanımı, 1. *Doğu Akdeniz Zeytin ve Zeytinyağı Zirvesi*, 26-27.
- DREO, T., GRUDEN, K., MANCEAU, C., JANSE, J. D. and RAVNIKAR, M. 2007. Development of a Real-Time PCR-based method for detection of *Xylophilus ampelinus*. *Plant Pathology*, 56 (1): 9-16.
- ERSOY, A. 2002. Batı akdeniz bölgesinde zeytin ağaçlarında görülen *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin neden olduğu bakteriyel dal kanseri hastalığının yayılışı, etmenin moleküler tanısı, izolatlarının elde edilmesi ve moleküler karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, *Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. 72 s.
- ERCOLANI, GL. 1978. *Pseudomonas savastanoi* and other bacteria colonizing the surface of olive leaves in the field. *J Gen Microbiol*, 109: 245-57.
- ERCOLANI, G. L. 1993. Comparison of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* from olive leaves and knots. *Letters in Applied Microbiology*, 16(4): 199-202.
- ERTEM, H. 1987. The Flora of Anatolia during Hittite period according to archaeological texts obtained from Bogazkoy. Boğazkoy metinlerine göre Hititler devri Anadolu'sunun florası. *Atatürk Kültür, Dil ve Tarih Yüksek Kurumu, Türk Tarih Kurumu Publications*, 7 (65): 63-72.
- ESTI, M., CINQUANTA, L. and LA NOTTE, E. 1998. Phenolic compounds in different olive varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (1): 32-35.
- FAO, 2014. Faostat Gateway. Food and Agriculture Organization of the United Nations (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü). <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- FAO, 2015. Faostat Gateway. Food and Agriculture Organization of the United Nations (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü). <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCT>



- FERNANDES, A.M.M. 1994. Studies on olive knot disease in Portugal. *9th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union* Kuşadası, Aydın, 51 (7): 56-73 Türkiye.
- FERRARIS, A. 1926. Innovative capacity of Italian manufacturing firms. *Management*, 3 (3): 174-183.
- FLEMING, H. P. and ETCHELLS, J. L. 1967. Occurrence of an inhibitor of lactic acid bacteria in green olives. *Applied Microbiology*, 15 (5): 1178-118
- FRANCISCO. F., KLEE, H., WHITE, F., NORDEEN, R., and KOSUGE, T. 1990. Expression and fine structure of the gene encoding N epsilon-(indole-3-acetyl)-L-lysine synthetase from *Pseudomonas savastanoi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87 (15): 5797-5801.
- FREEMAN, W. M., WALKER, S. J. and VRANA, K. E. 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*, 26: 112-125.
- FURNERI, P.M., MARINO, A., SAIJA, A., UCCELLA, N. and BISIGNANO, G. 2002. *In vitro* antimycoplasmal activity of oleuropein. *Int. J. Antimicrob. Age*. 20: 293-296.
- GALLELLI, A., TALOCCI, S., PILOTTI, M. and LORETI, S. 2014. Real-Time and qualitative PCR for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolates causing recent outbreaks of kiwifruit bacterial canker. *Plant Pathol.*, 63: 264-276.
- GARDAN, L., BOLLET, C., ABU GIIORRAH, M., GRIMONT, P. A. D. and GRIMONT, F. 1992a. DNA relatedness among pathovar strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janse (1982) and proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 606-612
- GARDAN, L., DAVID, C., MOREL, M., GLICKMANN, E., ABU-GHORRAH, M., PETİT, A. and DESSAUX, Y. 1992b. Evidence for a correlation between auxin production and host plant species among strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (5): 1780-1783.
- GARIBAĞAOĞLU, M. ve BAYSAL, A. 1998. Kırlangıç zeytinyağı tanıtım kitapçığı, İstanbul, 32s.
- GİKAS, E., BAZOTI, F.N. and TSARBOPOULOS, A. 2007. Conformation of Oleuropein, the major bioactive compound of *Olea europea*. *J. Mol. Struct. Theochem.* 821: 125-132.

- GOTTSBERGER, R.A. 2010. Development and evaluation of a Real-Time PCR assay targeting chromosomal DNA of *Erwinia amylovora*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 51 (3): 285-292.
- GTB, 2016 Yılı zeytin ve zeytinyağı raporu. Gümrük ve Ticaret Bakanlığı Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü. Ankara, 23 s.
- GUO, Y., ZHENG, H., YANG, Y. and WANG, H. 2007. Characterization of *Pseudomonas corrugata* strain P94 isolated from soil in Beijing as a potential biocontrol agent. *Curr. Microbiol.*, 55: 247-253.
- HALL, B. H., COTHER, E. J., WHATTAM, M., NOBLE, D., LUCK, J., and CARTWRIGHT, D. 2004. First report of olive knot caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* on olives (*Olea europaea*) in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 33 (3): 433-436.
- HEHN, V. 1998. Zeytin, Üzüm ve İncir. Çeviren Necati Aça, Dost Kitabevi Yayınları, Ankara, 112 s.
- HEYDARI, A., KHODAKARAMIAN, G. and DOUSTMORAD, Z. 2014. Occurrence, genetic diversity and pathogenicity characteristics of *Pseudomonas viridiflava* inducing alfalfa bacterial wilt and crown root rot disease in Iran. *Eur. J. Plant Pathol.*, 139: 299-307.
- HEYWOOD, V., LAWALRÉE, A., H, MOORE., D. M., RICHARDSON, I. B. K. and STEARN, W. T. 1978. *Flowering plants of the world*. 65 (2): 123-156
- HULETSKY, A., GIROUX, R., ROSSBACH, V., GAGNON, M., VAILLANCOURT, M., BERNIER, M., and VAN BELKUM, A. 2004. New Real-Time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. *Journal of clinical microbiology*, 42 (5): 1875-1884.
- HREN, M., BOBEN, J., ROTTER, A., KRALJ, P., GRUDEN, K. and RAVNIKAR, M. 2007. Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. *Plant Pathology*, 56 (5): 785-796.
- IACOBELLIS, N. S., CAPONERO, A., EVIDENTE, A. 1998. Characterization of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* strains isolated from ash. *Plant Pathology*, 47 (1): 73-83.

- JANSE, J. D. 1981. The bacterial disease of ash (*Fraxinus excelsior*), caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* pv. *fraxini* II. Etiology and taxonomic considerations. *European Journal of Forest Pathology*, 11 (7): 425-438.
- JANSE, J. D. 1982. *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* (ex Smith) subsp. nov., nom. Rev., the bacterium causing excrescences on *Oleaceae* and *Nerium oleander* *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 32: 166-169.
- JANSE, J. D. 2005. *Phytobacteriology Principles and Practice*. CABI, pp. 359, USA.
- JAPÓN-LUJÁN, R., LUQUE-RODRÍGUEZ, J. M. and DE CASTRO, M. L. 2006. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Chromatography A*, 1108 (1): 76-82.
- JOHNSON, K.L. and WALCOTT, R.R. 2012. Progress towards a Real-time PCR assay for the simultaneous detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and Pepino mosaic virus in tomato seed. *J. Phytopathol.*, 160 (7-8): 353-363.
- KANG, H.W., KWON, S.W. and GO, S.J. 2003. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. *Plant Pathol.*, 52: 127-133.
- KARACA, I. 1977. Fitobakteriyoloji ve Bakteriyel Hastalıklar. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları* 294.
- KAVAK, H. and ÜSTÜN, N. 2009. Oleander knot caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 701-703.
- KHLAIF, H. 1999. Olive Knot Disease in Jordan. *The Higher Council for Sciences and Technology*. Hashemite Kingdom of Jordan. pp. 42, in Arabic.
- KLEMENT, Z., RUDOLPH, K. and SANDS, D.C. 1990. *Methods in Phytobacteriology*. Akademiai Kiado. Maryland and Washington, D.C. pp. 136
- KRID, S., RHOUMA, A., QUESADA, J.M., PENYALVER, R. and GARGOURI, A. 2009. Delineation of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains isolated in Tunisia by random-amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 106 (3): 886-894.

- KRID, S., GHARSALLAOUI, M., TRIKI, M. A., and RHOUMA, A. 2011. Epidemiologie et etiologie de *Pseudomonas Savastanoi* pv. *savastanoi*, agent causal de la tuberculose de l'olivier en Tunisie. *Revue Ezzaitouna*, 12, 1.
- KRIEG, N. R. and HOLT, J. G. 1984. Bergey's Manual of Systemetic Bacteriology.-vol. 1. *William and Wilkins*, Baltimore, London. pp.186
- LEE, O.H. and LEE, B.,Y. 2010. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresour. Technol.* 101 (10): 3751.
- LELLIOTT, R.A., BILLING, E., and HAYWARD, A.C. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic Pseudomonads. *Journal of Applied Bacteriology*, 29 (3): 470-489.
- LELLIOTT, R.A. and STEAD, D.E. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. *Blackwell Scientific Publications*. pp. 216
- LICCIARDELLO, G., BELLA, P. and CATARA, V. 2011. Quantitative detection of *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea* in tomato plants by duplex Real-Time PCR. *J.Plant Pathol.*, 93 (3): 595-602.
- LOUWS, F. J., FULBRİGH, D. W., STEPHENS, C. T. and DE BRUIJN, F. J. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (7): 2286-2295.
- LUO, L. X., WALTERS, C., BOLKAN, H., LIU, X. L., and LI, J. Q. 2008. Quantification of viable cells of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using a DNA binding dye and a Real-Time PCR assay. *Plant Pathology*, 57 (2): 332-337.
- MALIK, N. S. and BRADFORD, J. M. 2006. Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina' olives. *Scientia Horticulturae*, 110 (3): 274-278.
- MARCELO A., M. FEMANDES, MF. POTES, JF. ERRANO IT. METZİDAKIS (Ed.), D.G. VOYIATZIS 1999. Proceedings of the 3th International symposium on olive growing Chania, Crete Oreece, 22-26 September 1997: Volume 2. *Acta Horticulturae*, 474: 581-584.
- MARCHI, G., VITI, C., GIOVANNETTI, L. and SURICO, G. 2005. Spread of levan-positive populations of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, the causal agent

- of olive knot, in central Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 112 (2): 101-112.
- MARCHI, G., SISTO, A., CIMMINO, A., ANDOLFI, A., CIPRIANI, M. G., EVIDENTE, A. and SURICO, G. 2006. Interaction between *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* and *Pantoea agglomerans* in olive knots. *Plant Pathology*, 55 (5): 614-624.
- MARCHI, G., MORI, B., POLLACCI, P., MENCUCCINI, M. and SURICO, G. 2009. Systemic spread of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive explants. *Plant Pathology*, 58 (1): 152-158.
- MAVRODI, O.V., MAVRODI, D.V., THOMASHOW, L.S. and WELLER, D.M. 2007. Quantification of 2,4-Diacetylphloroglucinol-Producing *Pseudomonas fluorescens* strains in the plant rhizosphere by Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73 (17): 5531-5538.
- MICOL, V., CATURLA, N., PEREZ-FONS, L., MAS, PEREZ VL. and ESTEPA, A. 2005. The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antivir. Res.* 66: 129–136.
- MIRIK, M., AYSAN Y., CİNAR, O. ve SAHİN, F. 2004. Türkiye’de çeşitli bitkilerden izole edilen *Pseudomonas savastanoi* izolatlarının fenotipik karakterizasyonu. Türkiye 1. Bitki Koruma Kongresi, 139, Samsun.
- MIRIK, M., AYSAN, Y. and SAHİN, F. 2006. Isolation, pathogenicity, and characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* from different hosts in Turkey. In *Proceedings of the 12th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union* (pp. 321-325).
- MIRIK, M., and AYSAN, Y. 2011. Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* isolates and disease prevalence of olive knot disease in Marmara Region of Turkey. *Journal of Agricultural Sciences (Turkey)*. 3: 312-318
- MIRIK, M., AYSAN, Y. ve SAHİN, F. 2011. Characterization of *Pseudomonas cichorii* isolated from different hosts in Turkey. *Inter. Jou. of Agriculture and Biology*, 13: 203-209.
- MOHAN, S. K., and SCHAAD, N. W. 1987. An improved agar plating assay for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. s.* pv. *phaseolicola* in contaminated bean seed. *Phytopathology*, 77 (10): 1390-1395.

- MORETTI, C., CORTESE, C., DA SILVA, D. P., VENTURI, V., TORELLI, E., FİRRAO, G. and BUONAURO, R. 2014. Draft genome sequence of a hypersensitive reaction-inducing *Pantoea agglomerans* strain isolated from olive knots caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. *Genome Announcements*, 2 (4): 774-814.
- OWEN, R.W., GIACOSA, A., HULL, W.E., HAUBNER, R., WURTELE, G., SPIEGELHALDER, B. and BARTSCH, H. 2000. Olive oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet. Oncol.* 21: 107–112.
- OKSEL, C. 2014. Zeytin dal kanseri etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'ye karşı *in vitro* koşullarda farklı bitkilerin uçucu yağlarının etkisi (Master's thesis, Namık Kemal Üniversitesi). 64 s.
- OZTURK, F., YALÇIN, M. and DIRAMAN, H. 2009. An overview on the olive oil economy of Turkey. *Electron J Food Technol*, 12: 37-53.
- OZKAYA, M. T., TUNALIOĞLU, R., EKEN, Ş., ULAŞ, M., TAN, M., DANACI, A., ve TIBET, Ü. 2008. Türkiye zeytinciliğinin sorunları ve çözüm önerileri. TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, *Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi*, 11-15.
- PALLERONI N. J. and JOHNSON, J. L. 1989. Deoxyribonucleic acid similarities among *Pseudomonas* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 230-235
- PANAGOPOULOS, C. G. 1993. Olive knot disease in Greece 1. *EPPO Bulletin*, 23 (3): 417-422.
- PANIZZI, L., SCARPATI, M. L., and ORIENT, G. 1960. The constitution of oleuropein, a bitter glucoside of the olive with hypotensive action. *Gazz. Chim. Ital*, 90: 1449-85.
- PENYALVER, R., GARCÍA, A., FERRER, A., BERTOLINI, E. and LÓPEZ, M. M. 2000. Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (6): 2673-2677.
- PENYALVER, P., HUERTA, B., BORGE, C., ASTORGA, R., ROMERO, R. and PEREA, A. 2005. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family. *Apmis*, 113 (1): 1-6.

- PENYALVER, R., GARCÍA, A., FERRER, A., BERTOLINI, E., QUESADA, J. M., SALCEDO, C. I., PIQUER, J., PÉREZ-PANADÉS, J., CARBONELL, E. A., DEL RÍO, C., CABALLERO, J. M., and LÓPEZ, M. M. 2006. Factors affecting *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plant inoculations and their use for evaluation of olive cultivar susceptibility. *Phytopathology*, 96: 313-319.
- PEREIRA, J. A., PEREIRA, A. P., FERREIRA, I. C., VALENTÃO, P., ANDRADE, P. B., SEABRA, R. and BENTO, A. 2006. Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential, and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (22): 8425-8431.
- PETERSEN, M. and WENGEL, J. 2003. LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends Biotechnol.*, 21: 74-81.
- POWELL, G. K. and MORRIS, R. O. 1986. Nucleotide sequence and expression of a *Pseudomonas savastanoi* cytokinin biosynthetic gene: homology with *Agrobacterium tumefaciens* *tmr* and *tzs* loci. *Nucleic Acids Research*, 14 (6): 2555-2565.
- PRIEGO-CAPOTE, F. and DE CASTRO, M. L. 2004. Analytical uses of ultrasound I. sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23 (9): 644-653.
- PUJOL, M., BADOSA, E., MANCEAU, C. and MONTESINOS, E. 2006. Assessment of the environmental fate of the biological control agent of Fire Blight, *Pseudomonas fluorescens* EPS62e, on apple by culture and Real-Time PCR methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 (4): 2421-2427.
- QIN, X., EMERSON, J., STAPP, L., ABE, P. and BURNS, J. L. 2003. Use of Real-Time PCR with multiple targets to identify *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting Gram-negative bacilli from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.*, 41 (9): 4312-4317.
- QUESADA, J. M., PENYALVER, R., PÉREZ-PANADÉS, J., SALCEDO, C. I., CARBONELL, E. A. and LÓPEZ, M. M. 2010. Dissemination of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations and subsequent appearance of olive knot disease. *Plant Pathology*, 59 (2): 262-269.
- QUESADA, J. M., PENYALVER, R., PÉREZ-PANADÉS, J., SALCEDO, C. I., CARBONELL, E. A. and LÓPEZ, M. M. 2010. Comparison of chemical treatments for reducing epiphytic *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

- populations and for improving subsequent control of olive knot disease. *Crop Protection*, 29 (12): 1413-1420.
- RAEYMAEKERS, L. 2000. Basic principles of quantitative PCR. *Molecular Biotechnology*, 15 (2): 115-122.
- RAMOS, C., MATAS, I.M., BARDAJI, L., ARAGON, I.M. and MURILLO, J. 2012. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: some like it knot. *Molecular Plant Pathology*, 13 (9): 998-1009.
- RENIS, H.E. 1975. Inactivation of myxoviruses by calcium elenolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 8: 194–199.
- RHOUMA, A., BEN DAOUD, H., GHANMÍ, S., BEN SALAH, H., ROMDHANE, M. and DEMAK, M. 2009. Antimicrobial activities of leaf extracts of *Pistacia* and *Schinus* species against some plant pathogenic fungi and bacteria. *Journal of Plant Pathology*, 3 (13): 339-345.
- RYAN, D., ROBARDS, K. and LAVEE, S. 1999. Changes in phenolic content of olive during maturation. *International Journal of Food Science and Technology*, 34 (3): 265-274.
- SAIJA, A., TROMBETTA, D., TOMAİNO, A LO CASCIO, R., PRINCI, P., UCCELLA BONINA, N.F. and CASTELLI, F. 1998. *In-vitro* evaluation of the antioxidant activity and bio-membrane interaction of the plant phenols oleuropein and hydroxytyrosol. *Int. J. Pharm.* 166: 123-133.
- SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A., and ARNHEIM, N. 1985. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230 (4732): 1350-1354.
- SALM, H. and GEIDER, K. 2004. Real-time PCR for detection and quantification of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fireblight. *Plant Pathol.*, 53 (5): 602-610.
- SÁNCHEZ, C.S., GONZÁLEZ, A.T., GARCIA-PARRILLA, M.C., GRANADOS, J.Q., DE LA SERRANA, H.L.G. and MARTÍNEZ, M.L. 2007. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica Chimica Acta*, 593 (1): 103-107.
- SANCHEZ, J.C., ALSINA, M.A., HERRLEIN, M.K. and MESTRES, C. 2007. Interaction between the antibacterial compound oleuropein and model membranes. *Colloid Polym. Sci.* 285: 1351–1360.



- SAVRAN, M.K. and DEMİRBAŞ, N. 2011. Türkiye'de Sofralık Zeytinde Kalite Sorunu ve Öneriler. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25 (2): 45-43
- SAYGILI, H., ŞAHİN, F., AYSAN, Y. 2008. Bitki bakteri hastalıkları. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, İzmir. 317 s.
- SAYDAN, I.B. 2015. TR63 bölgesi Zeytincilik Sektör Raporu 25 s.
- SERVI, D. 2009. The determination of prevalence and identification by pcr techniques of olive knot disease (*Pseudomas savastanoi* pv. *savastanoi*) in Aydin province. agris.fao.org
- SERVI, D. and BAŞTAŞ, K.K. 2012. Aydın İli'nde Zeytin Bakteriye Dal Kanseri Hastalığı (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*)'nın Tespiti ve Tanılanması. *Selçuk Tarım Bilimleri Dergisi*, 26 (3): 1-8.
- SCHAAD, N.W., BERTHIER-SCHAAD, Y., SECHLER, A. and KNORR, D. 1999. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. *Plant Disease*, 83 (12): 1095-1100.
- SCHAAD, N.W. and FREDERICK, R.D. 2002. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24 (3): 250-258.
- SCHAAD, N.W., OPGENORTH, D. and GAUSH, P. 2002. Real-Time Polymerase Chain Reaction for one-hour on-site diagnosis of pierce's disease of grape in early season asymptomatic vines. *The Am. Phytopathol. Soc.*, 92 (7): 721-728.
- SISTO, A., MOREA, M., ZACCARO, F., PALUMBO, G. and IACOBELLIS, N.S. 1999. Isolation and characterization of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* mutants defective in hypersensitive response elicitation and pathogenicity. *Journal of Phytopathology*, 147 (6): 321-330.
- SISTO, A., CIPRIANI, M.G. and MOREA, M. 2004. Knot formation caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* on olive plants is *hrp*-dependent. *Phytopathology*, 94 (5): 484-489.
- SKERMAN, T.M. 1989. Isolation and identification of *Bacteroides nodosus*. *Footrot and Foot Abscess of Ruminants*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, pp. 85-104.

- SOLER-RIVAS, C., ESPÍN, J.C. and WICHERS, H.J. 2000. Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (7): 1013-1023.
- SMIDT, M. and KOSUGE, T. 1978. The role of indole-3-acetic acid accumulation by alpha methyl tryptophan resistant mutants of *Pseudomonas savastanoi* in gall formation on oleanders. *Physiological Plant Pathology* 13: 203-214.
- SMITH, E., F. and RORER, J.B. 1904. The olive tubercle. e. *Science* 19: 416- 417.
- SMITH, E., F. 1908. Recent studies on the olive tubercule organism. *Bull. Bur. Plant Ind. U. S. Dep. Agric.* 131: 2543.
- SURICO, G., IACOBELLIS, N.S. and SISTO, A. 1985. Studies on the role of indole-3-acetic acid and cytokinins in the formation of knots on olive and oleander plants by *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Physiological Plant Pathology*, 26 (3): 309-320.
- SURICO, G. and LAVERMICOCCA, P. 1989. A semiselective medium for the isolation of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Phytopathology*, 79: 185-190.
- SURICO, G. and IACOBELLIS, N.S. 1992. Phytohormones and olive knot disease. *Molecular Signals in Plant-Microbe Communications*, 13 (6): 209-227.
- SURICO, G. 1993. Scanning electron microscopy of olive and oleander leaves colonized by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. *Journal of Phytopathology*, 138 (1): 31-40.
- TASSOU, C.C., Nychas, G.J.E. and Board, R.G. 1991. Effects of phenolic compounds and oleuropein on the germination of *Bacillus cereus* T spores. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 13 (2): 231-237.
- TAŞCI, S., GUNDOĞDU, M. A., GUR, E., ve ŞEKER, M. 2010. Gemlik zeytin çeşidi (*Olea europaea* L.) çeliklerinde *Trichoderma harzianum* uygulamalarının kök gelişimi, fidan kalitesi ve karbonhidrat birikimi üzerine etkilerinin belirlenmesi. *I* (49): 1309-5889.
- TATLI, B. ve BENLIOĞLU, K. 2004 Aydın ve Muğla illerinde zeytin ağacı uru *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* hastalığı üzerine çalışmalar. T.C. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı, 62 s.
- TATLI, B. 2004. Aydın ve Muğla illerinde zeytin ağacı uru *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* ((ex Smith) Gardan, 1992) hastalığı üzerinde çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi 64 s.

- TEHABSIM, A., KHADAIR, M.A. and JANSE, J.D. 1991. Occurrence and distribution of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* in Jordan/Presenza e diffusione di *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* in Giordania. *Phytopathologia Mediterranea*, 30 (1): 64-66.
- TETİK, H.D. 2005. Sofalık Zeytin İşleme Teknikleri. Emre Basımevi, 5. Baskı, Yayın No:53, 136 pp, İzmir.
- TEVIOTDALE, B., L. 1994. Olive Production Manua (L8. Part. Pest Management Diseases of Olive ). 107 pp.
- TEVIOTDALE, B.E. 1994. Diseases of olive. Olive Production Manual. 3353: 107-109.
- TOKUSOĞLU, O., ALPAS, H. and BOZOĞLU, F. 2010. High hydrostatic pressure effects on mold flora, citrinin mycotoxin, hydroxytyrosol, oleuropein phenolics and antioxidant activity of black table olives. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11 (2): 250-258.
- TRIPOLI, E., M. GIAMMANCO, G. TABACCHI, D. DI MAJO, S. GIAMMANCO and M. LA GUARDIA. 2005. The phenolic composition of olive oil: structure, biological activity, and beneficial effects on human health. *Nutr. Res. Rev.* 18: 98-112.
- TUCK, K.L. and HAYBALL, P.J. 2002. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13 (11): 636-644.
- TUIK, 2014 <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>
- TUNALIOĞLU, R. 1998. Türkiye Zeytinciliğinin Genel Durumu. Zeytin Yetiştiriciliği Kursu Kitabı, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir.
- TUNALIOĞLU, R. 2009. Türkiye’de Zeytincilik ve Pazarlama Politikaları: 2000-2010. *Tarım 2015 Zeytin ve Zeytinyağı Sempozyumu*, 29: 1-13.
- ULGER, S. 1989. Farklı ortamlarda, hormon kullanımıyla, değişik zeytin çeşitlerinin köklendirilmesi (Doctoral dissertation, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü 82 s).
- VANNESTE, J.L., CORNİSH, D.A., YU, J. and STOKES, C. 2017. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* the causal agent of bacterial canker of

- kiwifruit on *Actinidia arguta* vines in New Zealand. *Plant Pathology*, 66 (1) : 140-149.
- VARVARO, L. and FERRULLI, M. 1983. Sopravvivenza di *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* (Smith) Young et al. sulle foglie di due varietà di olivo (*Olea europea* L.). *Phytopathologia Mediterranea*, 4 (1): 17-30.
- VARVARO, L. and SURICO, G. 1984. Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* and its multiplication in host tissues. u. S. Workshop/Seminar "Plant Pathology and Quarantine" Roma (Italy) , 17- 21 September.
- VISIOLI, F., BELLOMO, G., MONTEODORO, G. and GALLI, C. 1995. Low density lipoprotein oxidation is inhibited *in vitro* by olive oil constituents. *Atherosclerosis*, 117 (1) : 25-32.
- VISIOLI, F., BELLOMO, G. and GALLI, C. 1998. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247 (1): 60-64.
- VISIOLI, F., BELLOSTA, S. and GALLI, C. 1998. Oleuropein, the bitter principles of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Sci.* 62: 541–546.
- VISIOLI, F., POLI, A. and GALLI, C. 2002. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med. Res. Rev.* 22: 65–75.
- WANG, X., DODDAPANENI, H., CHEN, J., and YOKOMI, R.K. 2014. Improved Real-Time PCR diagnosis of citrus stubborn disease by targeting prophage genes of *Spiroplasma citri*. *Plant Dis.*, <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-06-14-0572-RE>.
- WELLER, S.A., ELPHINSTONE, J.G., SMITH, N.C., BOONHAM, N. and STEAD, D.E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, Real-Time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (7): 2853-2858.
- WILSON, E.E. 1965. Pathological histogenesis in oleander tumors induced by *Pseudomonas savastanoi*. *Phytopathology* 55: 1244–1249.
- WILLIS, D.K., RICH, J.J. and HRABAK, E.M. 1991. *Hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 4: 132-138.

- WINKELHAUSEN, E., POSPIECH, R. and LAUFENBERG, G. 2005. Antifungal activity of phenolic compounds extracted from dried olive pomace. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia*, 24 (1): 41-46.
- WONG, M.L. and MEDRANO, J.F. 2005. Real-Time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39 (1): 75.
- YOUNG, J.M., DYE, D.W., BRADBURY, J.F., PANAGOPOULOS, C.G. and ROBBS, C.F. 1978. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 21: 153-177
- YOUNG, J. M., SADDLER, G. S., TAKIKAWA, Y., De BOER, S. H., VAUTERIN, L., GARDAN, L., and STEAD, D. E. 1996. Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. *Review of Plant Pathology*, 75 (9): 721-763.
- YOUNG, J.M., PAULA WILKIE, J., FLETCHER, M.J., PARK, D.C., PENNYCOOK, S.R., TRIGGS, C.M. and WATSON, D.R.W. 2004 Relative tolerance of nine olive cultivars to *Pseudomonas savastanoi* causing bacterial knot disease. *Phytopathol Mediterr*, 43: 395-402.

## ÖZGEÇMİŞ



Doğancan AKTAŞ 1992 yılında Antalya'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Ahmet Bileydi İlköğretim okulunda, lise öğrenimini Antalya Aldemir Atilla Konuk Anadolu Lisesinde 2010 yılında tamamladı. 2011 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü'nden 2015 yılında 3,45 not ortalaması ile Ziraat Mühendisi olarak mezun oldu. Eylül 2015'te Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitime başladı. Yüksek lisans ders dönemini 2015/2016 yılında tamamladı ve 2016/2017'de tez dönemine başladı.

